



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, A61K 38/17, 38/57, C07K 14/525</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/14325</p>
		<p>(43) 国際公開日 1999年3月25日(25.03.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04187</p> <p>(22) 国際出願日 1998年9月17日(17.09.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/252541 1997年9月17日(17.09.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 持田製薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒160-8515 東京都新宿区四谷1丁目7番地 Tokyo, (JP) 財団法人 大阪バイオサイエンス研究所 (OSAKA BIOSCIENCE INSTITUTE)(JP/JP) 〒565-0874 大阪府吹田市古江台6丁目2番4号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 長田重一(NAGATA, Shigekazu)(JP/JP) 〒562-0025 大阪府箕面市薬生外院4-3-18 Osaka, (JP) 田中正人(TANAKA, Masato)(JP/JP) 〒565-0837 大阪府吹田市佐井寺南が丘8-11-805 Osaka, (JP)</p>	<p>(74) 代理人 弁理士 渡辺望稔, 外(WATANABE, Mochitoshi et al.) 〒101-0032 東京都千代田区豊本町2丁目12番5号 早川トナカイビル3階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: NOVEL Fas LIGAND DERIVATIVE</p>		
<p>(54)発明の名称 新規Fasリガンド誘導体</p>		
<p>(57) Abstract A soluble Fas ligand functioning as a Fas antagonist or apoptosis modulator; a novel Fas ligand derivative having an excellent apoptosis inducer or cytotoxic activity; and a DNA coding for the peptide.</p>		

本発明はF a s アンタゴニストまたはアポトーシス調節物質として機能する可  
 溶型F a s リガンド、アポトーシス誘導活性または細胞障害活性に優れた新規な  
 F a s リガンド誘導体および該ペプチドをコードするDNAを提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサオ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NZ	ニュー・ジーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KR	韓国	SD	スーダン		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン				

## 明 細 書

新規 F a s リガンド誘導体

## 技術分野

本発明は、様々な疾患に関与するアポトーシスを制御することができる F a s  
5 リガンドに関する。

## 背景技術

F a s リガンド（以下、F a s Lとする）はF a s L、TNF、リンフォ  
トキシン、T R A I L（TNF関連アポトーシス誘導リガンド）、C D 4 0  
リガンド（C D 4 0 L）、C D 2 7リガンド（C D 2 7 L）、C D 3 0リガンド  
10（C D 3 0 L）、およびO X 4 0リガンド（O X 4 0 L）を含む腫瘍壊死  
因子（TNF）ファミリーに属す（ナガタ、Cell, 88, 355-365, 1997；ウィリー  
等、Immunity, 3, 673-682、1995）。リンフォトキシンの $\alpha$ 鎖以外のTNFファ  
ミリーの大部分はII型の膜タンパク質として合成される。しかしF a s Lの可溶  
型、TNF $\alpha$ 、およびC D 4 0 Lはこれらの分子を発現する細胞の培養上清中で  
15 見つかри、これらのTNFファミリーの構成員は膜から切断（切り出）されるこ  
とを示す（ペレ等、Cell, 63, 251-258, 1990；ピエトラベール等、J. Biol.  
Chem., 271, 5965-5967, 1996b；タナカ等、EMBO J., 14, 1129-1135, 1995）。メタ  
ロプロテアーゼの阻害剤はTNF $\alpha$ と同様F a s Lの放出を妨げるので、メタロ  
プロテアーゼが膜結合型F a s LやTNF $\alpha$ がその可溶型を生み出すのに関与す

ると考えられた（ジーリング等、Nature 370, 555-557, 1994；マックジーハム等、Nature, 370, 558-561, 1994；モラー等、Nature, 370, 218-220, 1994；タナカ等、Nature Med. 2, 317-322, 1996）。最近、特異的にTNF $\alpha$ を切断するメタロプロテアーゼがADAMメタロプロテアーゼファミリーの一員として同定された（ブラック等、Nature 385, 729-733, 1997；モス等、Nature, 385, 733-736, 1997）。これに対してTNFファミリー構成員の膜からの放出の生理学的役割は十分には解析されていない。

FasLは、TNFレセプターファミリーの一員であり、かつCD95やAPO-1とも呼ばれる、そのレセプターFasに結合することによって、アポトーシスを引き起こす。FasLは、主として、ナチュラルキラー細胞（NK）と同様、活性化されたT細胞で発現し（アラセ等、J. Exp. Med., 181, 1235-1238, 1995；スタ等、J. Immunol., 154, 3806-3813, 1995；タナカ等、Nature Med. 2, 317-322, 1996）、一方Fasは様々な細胞で普遍的に発現する（フレンチ等、J. Cell. Biol. 335-343, 1996；レーザンサー等、Lab. Invest. 69, 415-429, 1993；スタ等、J. Immunol., 154, 3806-3813, 1995；ワタナベフクナガ等、J. Immunol., 148, 1274-1279, 1992）。FasやFasLが欠損しているマウスの分析によりFasLがCD8T細胞やCD4Th1型T細胞のような細胞障害性Tリンパ球（CTL）の主要作用分子の1つであることが示された（ハナブチ等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 4930-4934, 1994；スタ等、J. Immunol., 154, 3806-3813, 1995；ビグノークスおよびゴルステン、Eur. J. Immunol., 24, 923-927, 1994）。CTLの役割はウイルスに感染した細胞や癌細胞を除去し、動物体内でウイルスや癌細胞が拡散増殖するのを防ぐことである。しかし、この系が過剰に

作用したとき、組織の破壊が引き起こされる。肝炎、インシュリン依存性糖尿病、および甲状腺炎（橋本病）のようなCTL介在自己免疫疾患ではFasLが誘導するアポトーシスが関与する可能性が示唆されてきた（シェルボンスキー等、Cell 89, 17-24, 1997；ジオルダノ等、Science, 275, 960-963, 1997；コンドウ等、Nature Med., 3, 409-413, 1997）。

上述のとおり、膜結合型FasLは切断されて可溶型になる。可溶型ヒトFasLは、少なくともFasを過剰に発現するマウスWR19L細胞形質転換体にアポトーシスを誘導する機能がある（タナカ等、EMBO J., 14, 1129-1135, 1995）。可溶型FasLは、NKリンパ腫、TやNK型の大型顆粒白血病患者の血清中で高値を示す（タナカ等、Nature Med. 2, 317-322, 1996）。これらの白血病患者はしばしば肝炎や好中球減少症を呈するので、TNFで見られるとおり、FasLの可溶型が全身性組織破壊を引き起こすことが仮定される。一方、ヒト可溶型FasLの組み換え型をマウスに投与した際、Propionibacterium Acnesによる前処理でFasL誘導致死に対するマウスの感受性を挙げたにもかかわらず、大量のFasLが致死効果を示すのに必要であった（タナカ等、J. Immunol., 158, 2303-2309, 1997）。

#### 発明の開示

これらの結果は本発明者が可溶型と膜結合性のFasLの細胞障害活性を比較し、膜からのFasLの放出の生理学的役割を調べるきっかけとなった。

20 本発明者は、発現するマウスのT細胞形質転換体の培養上清からヒトFasLを精製した。そのN末端配列分析により本発明者はヒトFasLの切断部位を決

定できた。切断部位近傍のアミノ酸欠失変異は膜結合型 F a s L の切断を完全に阻害した。ヒトジャーカット T 細胞株とマウス肝細胞はむしろ可溶型 F a s L に耐性があることがわかったが、それらは効率的に膜結合型 F a s L により殺された。また、可溶型 F a s L は肝細胞に対する膜結合型 F a s L 誘導細胞障害を阻害する。これらの結果は F a s L の細胞膜からの放出は F a s L の細胞障害活性をダウンレギュレートすることを示唆する。

本発明は F a s アンタゴニストまたはアポトーシス調節物質として機能する可溶型 F a s リガンド、アポトーシス誘導活性または細胞障害活性に優れた新規な F a s リガンド誘導体および該ペプチドをコードする DNA を提供しようとする。

F a s リガンドは II 型の膜タンパク質であり、腫瘍壊死因子 (TNF) ファミリーに属しており、レセプターである F a s に結合することによりアポトーシスを誘発する。F a s L は推定されるプロセッシング酵素であるメタロプロテアーゼにより切断され、可溶型のタイプを生じる。本発明者はヒトの可溶型 F a s L をヒトの F a s L を発現するマウス細胞の形質転換体の上清から精製し、その開裂箇所を特定した。開裂箇所近傍の 4 ~ 23 アミノ酸の欠失はヒト F a s L の膜からの放出を妨げた。しかし、アポトーシスの誘導活性は保持していた。F a s を過剰に発現するマウス WR 19 L 細胞は F a s L の可溶型タイプと同様に、膜結合 F a s L に感受性がある。しかしながら、低濃度で内因性 F a s を発現するジャーカット細胞やマウス初代培養肝細胞はむしろ可溶型 F a s L に耐性がある。膜結合型 F a s L がエフェクターとして用いられたとき、ヒトジャーカット細胞とマウス肝細胞は効率的に殺傷される。さらに、可溶型 F a s L はマウス

肝細胞に対する膜結合型 F a s L の細胞障害性を阻害する。これらの結果は膜結合型は機能性の型で、その活性は膜からの可溶型 F a s L の放出によりダウンレギュレーションされることを示す。

すなわち、本発明は、プロテアーゼ（蛋白分解酵素）に耐性の、又は抵抗  
5 性の、もしくは感受性の低下した F a s リガンド誘導体、具体的には天然型ヒト F a s リガンドの N 末端から 1 2 9 ~ 1 3 0 番目のアミノ酸が欠失または置換され、かつ、1 1 1 ~ 1 2 8 番目、1 3 1 ~ 1 3 3 番目のアミノ酸のうち少なくとも一つが欠失または置換されたアミノ酸配列からなるもの、またはその 8 ~ 6 9  
10 番目のアミノ酸が欠失した配列からなるものである。好ましくは、配列番号 1 または 2 に記載したアミノ酸配列を含有する新規 F a s リガンド誘導体、およびこれらの新規 F a s リガンド誘導体をコードする DNA を提供する。

さらに、本発明は、F a s アンタゴニストまたはアポトーシス調節物質として機能する可溶型 F a s リガンド、および可溶型 F a s リガンドを含有するアポトーシス調節剤を提供し、これらを投与する F a s リガンド誘導アポトーシス  
15 が関与する疾患の予防治療方法を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、精製されたヒト可溶型 F a s リガンドを示す図である。

(A) は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析の結果を示す。

20 (B) は、可溶性 F a s L の細胞障害活性を示すグラフである。

図 2 は、欠失や点変異を有する F a s L 構築の概要図である。

図3は、形質転換体におけるヒトFasLの免疫的検出結果を示す図である。

図4は、細胞表面上でのFasLの発現結果を示す図である。

図5は、膜結合型FasLのFasを過剰に発現するマウスW4細胞の細胞障害結果を示す図である。

図6は、ヒトジャーカット細胞に対する膜結合型FasLの増大された細胞障害活性の結果を示す図である。

図7(A)は、肝細胞に対する可溶型FasLの細胞障害活性を示し、(B)は、マウス肝細胞に対するFasLの細胞障害活性を示し、(C)は、可溶型FasLによる膜結合型FasLの細胞障害活性結果を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の第1の態様である新規FasL誘導体は、プロテアーゼに対して耐性の、または抵抗性の、もしくは感受性の低下したFasリガンド誘導体又は変異体である。特に、前記プロテアーゼが特にメタロプロテアーゼであり、および／または細胞膜結合型FasLを生体内又は試験管内で細胞から遊離する作用を有するプロテアーゼ、すなわちプロセッシング酵素である、Fasリガンド誘導体である。具体的には天然の膜結合型FasLのプロセッシング酵素による切断部位又はその近傍に何らかのアミノ酸残基の変異を有するもの、例えば、1以上のアミノ酸の欠失、置換または挿入、特に1以上、例えば4以上のアミノ酸の欠失を有するものがよい。本発明の新規FasL誘導体には、FasLの細胞外領域中、Fas結合性および／またはアポトーシス誘導能に必要な最小活性部分は必



須であり、生理的条件下で細胞膜等の膜に結合性を有する、膜結合領域を含有することが好ましいが、実施例に示すように、細胞内領域は少なくとも全体は必須ではない。細胞外領域と膜結合領域との結合は直接でもよいし、リンカーペプチド等を介して間接的であってもよい。また、膜貫通領域は必ずしも天然の F a s L 由来のものである必要はなく、場合によっては、ポリペプチド以外の膜結合性物質でもよいし、他の機能、例えば、多量体化能を有する物質を結合してもよい。なお、結合する膜としては細胞膜以外にリポソーム等が挙げられる。

本発明の第 1 の態様である新規 F a s リガンド誘導体の具体例としては、天然型ヒト F a s リガンドの N 末端から 1 2 9 ~ 1 3 0 番目のアミノ酸が欠失または置換され、かつ、1 1 1 ~ 1 2 8 番目、1 3 1 ~ 1 3 3 番目のアミノ酸のうち少なくとも一つが欠失または置換されたアミノ酸配列からなるもの、またはその 8 ~ 6 9 番目のアミノ酸が欠失した配列からなるものである。好ましくは、配列番号 1 に記載の配列、又はその 8 ~ 6 9 番目のアミノ酸を欠失した配列（以下 D 4 と称す）、および配列番号 2 に記載の配列、又はその 8 ~ 6 9 番目のアミノ酸を欠失した配列（以下 D 5 と称す）に記載のアミノ酸配列からなるものである。配列番号 1 または D 4 は天然型のヒト F a s リガンドの N 末端から 1 1 1 ~ 1 3 3 番の 2 3 アミノ酸が欠失したものであり、配列番号 2 又は D 5 は天然型のヒト F a s リガンドの N 末端から 1 2 8 ~ 1 3 1 番の 4 アミノ酸が欠失したものである。これらは膜結合型 F a s リガンドを 1 2 9 番の L y s と 1 3 0 番の G l n の間で切断して可溶型 F a s リガンドを放出するメタロプロテアーゼの作用箇所近傍のアミノ酸が欠失している。上記の膜結合型 F a s リガンド誘導体は欠失変異を有するが、その細胞障害活性は天然型の膜結合型 F a s リガンドと同

等以上である。

上述で具体例として示した天然型ヒト Fas リガンドの N 末端から 129  
～ 130 番目のアミノ酸が欠失または置換され、かつ、111～128 番  
目、131～133 番目のアミノ酸のうち少なくとも一つが欠失または置換され  
5 たアミノ酸配列、またはその 8～69 番目のアミノ酸が欠失した配列、並びに配  
列番号 1 に記載の配列、D4、配列番号 2 に記載の配列または D5 である、本発  
明の Fas リガンド誘導体は、メタロプロテアーゼ耐性、抵抗性、または感受性  
の低下した特性を有するため、メタロプロテアーゼによる分解を受けないので、  
膜から遊離せず、細胞障害活性が減少しないため、天然型の膜結合型 Fas  
10 リガンドより、効率的に標的細胞表面の Fas に作用し、アポトーシスのより優  
れた細胞障害活性を示すことができる。

なお、配列番号 1 または 2 に示したアミノ酸配列には、それぞれ 4 ヶ所の糖鎖  
付加可能部位（N-グリコシレーションサイト）があり、配列番号 1 においては、  
アミノ酸番号 76～78、161～163、227～229、237～239 が、配列番号 2 にお  
15 いては、アミノ酸番号 76～78、180～182、246～248、256～258 が糖鎖付加  
可能部位に相当する。本発明の新規 Fas リガンド誘導体はこの位置に糖鎖が付  
加していてもよい。

本発明の Fas リガンド誘導体が、遺伝子工学的に酵母や動物細胞等の真核細  
胞を宿主として生産されたものである場合は、糖鎖が付加される場合があり、こ  
20 れに対し、本発明の膜結合型 Fas リガンド誘導体が、大腸菌等の原核細胞を宿  
主として遺伝子工学的にポリペプチドを生産されたものである場合には、糖鎖の  
付加はない。

本発明のF a s リガンド誘導体は、アポトーシスを誘導し、生体にとって不要な細胞を除去するために使用することが可能である。たとえば、エイズウイルス感染細胞ではF a s 抗原が発現されているので、本発明のF a s リガンド誘導体は、エイズウイルス感染初期に使用してアポトーシスを人工的に誘導し、感染細胞を早期に除去する事により、エイズ治療に用いることができる。また、本発明のF a s リガンド誘導体は、ある種の自己免疫疾患に対しても、人為的にF a s 抗原を介したアポトーシスを生じさせる事により、自己抗原反応性のT細胞を除去することができる。また、本発明のF a s リガンド誘導体は、癌治療するために使用することができる。なお、モリモト H. (Morimoto H.)等は、癌細胞にF a s 抗原を介したアポトーシスを誘導する事によって、アドリアマイシンやシスプラチンによる制癌効果が相乗的に増強されることを報告している (Cancer Res., 53 巻、2591-2596 頁、1993年)。

本発明の第2の態様である可溶型F a s リガンドは、天然型のF a s リガンドの少なくとも1部を有し、界面活性剤等を用いなくても水溶液に可溶性であるもののうち、F a s アンタゴニストとして機能するもの、またはアポトーシス調節作用を有するものであれば特に制限されない。本発明において、F a s アンタゴニストとは、F a s /F a s リガンド系アンタゴニストというべきものであり、F a s によるシグナルの発生又は伝達をいずれかの段階で何らかの形で遮断し、F a s を介するアポトーシスを抑制又は阻害するものである。

本発明の可溶型F a s リガンドは、天然型のF a s リガンドの少なくとも1部を有し、界面活性剤等を用いなくても水溶液に可溶性であるもののうち、例えば、F a s 細胞外領域と相互作用し、天然型のF a s Lと競合したり、また

は、F a s のダウンレギュレーションを引き起こすものが挙げられる。このような可溶型F a s リガンドとしては、F a s リガンドの細胞外領域の少なくとも一部からなるものが例示され、好ましくはヒト天然型F a s リガンドのN末端から130番目のG l n からC末端までのアミノ酸配列からなるペプチドが例示される。

さらに、天然の膜結合型F a s リガンド、および天然の膜結合型F a s リガンドと同様に生体内または試験管内でメタロプロテアーゼにより切断されて可溶性F a s リガンドになるポリペプチドは、本発明の可溶型F a s リガンドの前駆体として用いられる。

- 10 本発明者は可溶型F a s リガンドがF a s L、特に膜結合型のF a s L誘導細胞障害を抑制すること、すなわち、F a s アンタゴニストまたはアポトーシス調節物質として作用し、アポトーシスを抑制、阻害または調節することを見出し本発明を完成させた。このような本発明のF a s アンタゴニストとして機能する可溶型F a s リガンドを用いることにより、F a s L誘導アポトーシスの治療、予防を行なうことができる。また、可溶型F a s Lを用いるF a s 機能またはアポ
- 15 トーシスの抑制若しくは調節方法、および可溶型F a s Lを含有するアポトーシス拮抗剤若しくは調節剤が提供される。

- 肝炎、インシュリン依存性糖尿病、および甲状腺炎（橋本病）のようなC T L 介在自己免疫疾患においてF a s L誘導アポトーシスが関与することが示されて
- 20 きた。さらに、アポトーシスが関与する疾患としては、例えば、免疫担当細胞あるいは肝細胞のアポトーシスにより組織の機能が著しく低下した結果生じると考えられる、エイズウイルス感染後期の免疫能の低下や、劇症肝炎における

肝機能低下が挙げられる。また、アポトーシスが関与する疾患として、心疾患、GVHD、腎疾患、虚血再灌流障害に基づく疾患及び臓器障害に基づく疾患が挙げられる。

- 例えば、心疾患としては、特に心筋梗塞等の虚血性心疾患、種々の原因による
- 5 心筋炎、心筋症、特に拡張型心筋症、心不全、並びに虚血再灌流障害及びそれに基づく心疾患等が；GVHDとしては、不適合性骨髄移植や先天性免疫不全症への骨髄移植等の骨髄移植後に起るGVHD、臓器移植後に起るGVHD、免疫低下した宿主に対する大量輸血等の輸血後に起るGVHD等が；虚血再灌流障害としては、肝臓、心臓、腎臓、肺、脾臓、小腸、大腸、胃、脾臓、脳、筋肉、皮膚
- 10 などにおいて認められる虚血再灌流障害及びそれに基づく疾患、例えば、肝不全、再灌流不整脈、腎不全、壊死性腸炎などで各臓器の損傷や機能障害が挙げられる。

- さらに、アポトーシスが関与する疾患として、上述した虚血再灌流障害に基づく疾患、アレルギー性接触皮膚炎または関節リウマチなどが、さらには、
- 15 SIRSに伴うMODS挙げられる。

また、アポトーシスが関与する疾患として、エンドトキシンによる臓器障害、特に肝臓障害又はエンドトキシン血症もしくは敗血症において、急性期のみならず、慢性的な障害が挙げられる。

- さらに、アポトーシスが関与する疾患として、肝臓においては、移植などの外科的
- 20 手術時、あるいはショックおよび循環不全などによる肝血流量（血液供給）の減少、あるいは遮断の際の虚血再灌流障害において、肝不全や組織障害ならびに肝機能低下が挙げられる。心臓においては、心筋梗塞に対する血栓

溶解療法、経皮的冠動脈内血栓溶解療法（P T C R）や経皮的冠動脈内腔拡張術（P T C A）後の再灌流の結果、細胞内カルシウムイオンの過負荷等に起因する不可逆的な細胞死や致死的な不整脈が挙げられる。また、腎臓においては、術後、または腎移植等に起因する虚血再灌流による腎不全や糸球体固有細胞（内  
5 皮細胞、上皮細胞、メサングウム細胞）、メサングウム基質、基底膜の細胞外基質または尿細管上皮細胞などの障害が挙げられる。

本発明の第1および第2の態様の、可溶型F a s リガンドおよびF a s リガンド誘導体は医薬組成物に用いることができる。この場合は、少なくとも一種の医薬用担体、または媒体、例えば滅菌水や生理食塩水、植物油、鉱油、高級  
10 アルコール、高級脂肪酸、無害性有機溶媒等、さらには必要に応じて賦形剤、着色剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、溶解補助剤、吸着防止剤、安定化剤、保存剤、保湿剤、酸化防止剤、緩衝剤、等張化剤、無痛化剤等と適宜組み合わせて注射剤や経口剤などの医薬組成物やキットの形態をとることができる。本発明の予防・治療剤は、好ましくは非経口的に、たとえば、静脈内注射、冠動脈内注射、  
15 筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身あるいは局部的に、ならびに急速もしくは持続的に投与することができる。本発明の予防・治療剤のヒトに対する投与量は患者の病態、年齢あるいは投与方法により異なるが、適宜適当な量を選択することが必要である。例えば、全身投与の場合、約0. 1－1 0 0 mg/kgの範囲で適当な分割容量を選択することができる。しかしながら、当該医薬組成  
20 物の使用はこれらの投与方法および投与量に制限されるものではない。さらに、他の薬剤と併用してもよい。

本発明の第1および第2の態様のF a s リガンドを医薬組成物に用いる場合は、

常法に従って、製剤化することができる。たとえば、注射用製剤は、精製された本発明の第1および2の態様のF a s リガンドを溶剤、たとえば、生理食塩水、緩衝液などに溶解し、それに、必要に応じて吸着防止剤などを加えたものであり、または、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであってもよい。

5 く、凍結乾燥のための一般的な賦形剤を使用することができる。

本発明の第1および第2の態様のF a s リガンドはいかなる方法で生産されたものであってもよい。例えば、ペプチド合成機（例えば、ペプチドシンセサイザー430A型、パーキンエルマージャパン（株）製）を使用して化学合成してもよい。

10 また、ヒトおよびヒト以外のいかなる生物の組織や細胞、体液から精製してもよい。ヒトや動物の体液としては、血液や尿が挙げられる。細胞としては、本発明の新規ポリペプチドを産生する細胞を適宜選択して用いることができる。例えば、脾細胞や胸腺細胞、リンパ球系細胞、および、それらの株化細胞などを、ノーザンブロットあるいはウエスタンブロット等で解析し、本発明の新規ポリペプチドの発現量の高いものを選択する。

15 リペプチドの発現量の高いものを選択する。

必要があれば、細胞をPMA（ホルボールミリステートアセテート）やイオノマイシン、PHA（フィトヘムアグルチニン）、Con A（コンカナバリンA）、IL-2（インターロイキン-2）等の刺激剤から選ばれる、1種もしくは2種以上の適切な刺激剤で刺激して産生誘導し、細胞もしくは培養上清から、当該ポリペプチドを精製してもよい。精製は、濃縮や、各種クロマトグラフィー、塩析など一般的に行われているポリペプチドの精製方法を適宜組み合わせ、F a s 抗原への結合性、もしくは、F a s 抗原を発現している細胞への細胞障害

20 該ポリペプチドを精製してもよい。精製は、濃縮や、各種クロマトグラフィー、塩析など一般的に行われているポリペプチドの精製方法を適宜組み合わせ、F a s 抗原への結合性、もしくは、F a s 抗原を発現している細胞への細胞障害

活性等を指標として行うことができる。

しかし、本発明の第1および第2の態様のF a s リガンドは、その純度の面から、遺伝子工学的に生産されたもの、すなわち、組換え型ポリペプチドであることが好ましい。当該ポリペプチドを遺伝子工学的に生産するには、適当なベクターに本発明の第1および第2の態様のF a s リガンドのc D N Aや本発明のD N A等を組み込み組換え遺伝子を得て、該組換え遺伝子で適当な宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養して培養混合物を回収し、当該ポリペプチドを精製する。また、該D N Aや組換えD N A分子を利用して無細胞系の合成方法（サムブルック J. (Sambrook, J.) et al.: Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1989年)）で得る方法も例示される。

本発明の第3の態様の新規D N Aは、本発明の新規F a s リガンド誘導体、特に配列番号1および2に記載されたアミノ酸配列、またはD 4、D 5をコードするものである。本発明のD N Aは、それが本発明の新規F a s リガンド誘導体をコードする限り、いかなる配列からなるD N Aであってもよい。同じアミノ酸をコードするD N Aのトリプレットは、アミノ酸の種類ごとに1～6種類迄存在することが知られており、同じペプチドをコードする塩基配列は1種類には限定されないが、このうちいずれのコドンを使用してもよい。

また、本発明のD N Aは、それが本発明の新規F a s リガンド誘導体をコードする塩基配列を含有する限り、c D N Aであってもイントロンを有する染色体D N Aであってもよい。しかしながら、ベクターへの導入の容易さ等、遺伝子工学的手法における扱い易さから、本発明の新規D N Aはc D N Aであることが



好ましく、配列番号 4、5 および 6 に記載された塩基配列を有するものが例示される。

本発明の新規 DNA は、1 本鎖であっても、それに相補的な配列を有する DNA や RNA と結合して 2 重鎖、3 重鎖を形成していても良い。

- 5    また、本発明の DNA の塩基配列が提供されることにより、RNA の配列、相補的な DNA および RNA の配列が一義的に決定される。

本発明の DNA は、本発明の新規 Fas リガンド誘導体を組み換え DNA 技術を使用して製造するために用いることができる。すなわち、本発明の DNA を、プロモーター配列等の発現に必要な配列を有する適当な発現ベクターの適当な位置に挿入し、このベクターで適当な宿主細胞を形質転換することによって、形質転換体に本発明の新規 Fas リガンド誘導体を発現させることができる。また、本発明の新規 DNA を適当なベクターに組み込んで、投与し、例えば、ガン、ウイルス疾患、自己免疫疾患等の遺伝的にアポトーシスの機構が欠損している疾患等の遺伝子治療にも使用する事ができる。さらに細胞株や生体外に取り出した細胞を本発明の DNA により形質転換し、それを生体に戻すことにより細胞治療を行なうこともできる。また、Fas L 誘導体を発現する移植用の臓器や組織を提供するためのトランスジェニック動物の作製に使用できる。

10

15

さらに、本発明の新規 DNA は、アンチセンス医薬の開発に使用したり、トランスジェニックマウス等、アポトーシスが関与する疾患のモデル動物の作製に使用したり、酵素等で標識して、組織における Fas リガンドおよびその誘導体の発現状況を検査し、アポトーシスが関与する疾患の診断に使用することができる。

20

本発明の新規DNAは化学合成やDNAライブラリーから得ることができる。

本発明の新規DNAを化学合成するには、たとえば、次のように行えばよい。

- すなわち、所望の塩基配列を有するDNAを約20塩基程度からなる断片に分けてDNA化学合成機（例えば、394型、パーキンエルマージャパン（株）製）  
5 を用いて合成し、その後、必要に応じて5'末端のリン酸化を行い、各断片を  
アニーリングし、ライゲーションして目的とするDNAを得る。

- 本発明の新規DNAをDNAライブラリーから得る例としては、適当なゲノム  
DNAライブラリーやcDNAライブラリーを、ハイブリダイゼーションによる  
スクリーニング法や、抗体を用いたイムノスクリーニング法等でスクリーニング  
10 し、目的のDNAを有するクローンを増殖させ、そこから制限酵素等を用いて切  
り出す方法がある。

本発明の新規DNAはまた、ゲノムDNAライブラリーもしくはcDNAライ  
ブラリーを鋳型とするPCR（Polymerase Chain Reaction）によっても得る事が  
できる。

- 15 以下に記載の条件に従って、本発明の1例を実施した。

#### （1）ヒト可溶性FasLの生産と精製

- ハムスター抗ヒトFasLモノクローナル抗体（clone 4H9）はタナカ  
等、Nature Med. 2, 317-322, 1996に記載されている。3. 5mlのリン酸緩衝化  
生理食塩水（PBS）中の抗体（10. 5mg）が5mlのプロテインA-  
20 セファロース4FFビーズ（ファルマシア社製）と混ぜられ、4℃で1時間保温  
した。ビーズは念入りにトリス緩衝化生理食塩水（TBS, 50mM Tris  
-HCl, pH 7. 4, 150mM NaCl）で洗浄し、200mMのほう酸

ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) で1度洗浄し、結合していないタンパク質を取り除いた。結合抗体は200 mMほう酸ナトリウム緩衝液に溶かした20 mMジメチルピメルイミデート (dimethyl pimemidate) (DMP) とインキュベートすることにより、ビーズに共有結合的に結合された。

ヒト FasL を発現するマウス WR19L 細胞形質転換体 (1A12 細胞) はタナカ等、Nature Med. 2, 317-322, 1996 に記載された。1A12 細胞 ( $1 \times 10^5$  細胞/ml) が5% FCS が補充された RPMI 1640 培地で3日間培養され、約2 L の培地が集められた。培地中のタンパク質は硫酸沈殿 (50-70%) で集められ、PBS で透析された。タンパク質は、次いで、PBS で平衡化された抗 FasL 抗体結合プロテイン A セファロースのカラム (1 ml) につけられた。カラムは150 mM の NaCl を含んだ50 mM Tris-HCl バッファー、pH 8.6 の20 ml で洗浄され、カラムに吸着した FasL は150 mM の NaCl を含む50 mM グリシン-HCl バッファー (pH 2.2) で溶出された。溶出液は直ぐに1 M Tris-HCl (pH 7.5) で中和され、PBS に透析され、セントリコン (アミコン社製) を用いて濃縮された。

N末端アミノ酸配列を決定するために、6  $\mu$ g の精製された FasL が0.1% の SDS が入っている10-20% のポリアクリルアミドゲル (第一純正化学社製) の電気泳動で分離された。タンパク質は、ブロッティング用のバッファーが0.075% SDS を含んでいた以外はフクナガ等、J. Biol. Chem., 265, 14008-14015, 1990 に記載のとおり PVDF 膜に30 V で16時間、電気ブ

ロッキングされた。膜上のタンパク質はクマジーブリリアントブルーで染色することにより検出され、宝酒造株式会社に依頼してN末端のアミノ酸配列がエドマン分解で決定された。

(2) 様々なヒト FasL の変異体を発現する形質転換体の確立

- 5 細胞内領域 (8 - 69 番のアミノ酸) が欠けたヒト FasL の発現プラスミド (pBOSHFLD1) がタナカ等、Nature Med. 2, 317-322, 1996 に記載された。鋳型として pBOSHFLD1 を用いた組み換え PCR により、切断部位に一連の欠失と点変異を有するヒト FasL 変異体用の発現プラスミド (pBOSHFLD4, pBOSHFLD5, および pBOSHFLD6)
- 10 が、作られた。要約すると、111 - 133 番のアミノ酸が欠失している pBOSHFLD4 を構築するために、FasL cDNA の 5' 部分が pEF-BOS ベクターのセンスプライマー (BOS6 ; CCTCAGACAGTGGTTCAAAG) (ミズシマ、ナガタ、Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990) と、アンチセンス欠失プライマー (DA4 ; TTTTCAGGGGGTGGAC
- 15 TGGGCTCCTTCTGTAGGTGGAAG、ヒト FasL の 105 - 110 番と 134 - 139 番のアミノ酸をコードする配列) により増幅された。cDNA の 3' 部分は DA4 プライマーに相補的なセンスプライマー (DS4) と、FasL cDNA の 3' 非コード領域の配列を有するプライマー (HF LP3 ; GCTCTAGAACATTCTCGGTGCCTGTAAC) で増幅され
- 20 た。PCR の条件はタカハシ等、Cell, 76, 969-976, 1994 に記載されたとおりである。最初の PCR 産物はアガロースゲル電気泳動で精製され、1 : 1 で混合され、次いでプライマー BOS6 と HF LP3 で第 2 回目の PCR で増幅された。

得られたDNA断片はXbaIで消化され、pEF-BOSベクターに挿入された。他の欠失や点変異は以下のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて同様な手法で作成された。つまり、pBOSHFLD5（128-131番のアミノ酸の欠失）に対しては、DA5（TGGACTGGGGTGGCCCAAAG  
5 ATGATGCTGT）とDS5プライマー（DA5に相補的）、pBOSHFLD6（Lys-129をAlaに置換）に対しては、DA6（GGGGTGGCCTATTTGTGCCTCCAAAGATGATGC）とDS6プライマー（DA6に相補的）である。マウスWR19L細胞はpPURと一緒にピューロマイシン耐性遺伝子（クローンテック社製）を有する発現プラスミドを、エレクトロポレーションでコトランスフェクションされた（イトウ等、Cell,  
10 66,233-243,1991）。ピューロマイシン耐性形質転換体は800ng/mlピューロマイシンで選択され、ヒトFasLを発現する形質転換体のクローンはフローサイトメトリー用のビオチン化された抗ヒトFasL抗体（4H9）およびPE標識ストレプトアビジン（ベクトンディキンソン社製）を用いたFACS  
15 分析により選択された。

### （3）細胞障害活性の分析

Fas発現W4細胞やジャーカット細胞に対するヒト可溶性FasLの細胞障害活性はタナカ等、EMBO J., 14, 1129-1135, 1995に記載のとおりMTT法により決定された。これに対し、Fas発現W4細胞やジャーカット細胞に対する  
20 FasL発現形質転換体の細胞障害活性は基本的にはスタ等、Cell, 75, 1169-1178, 1993に記載されたとおり<sup>51</sup>Cr-放出分析で決定された。要約すると、W4やジャーカット細胞（ $1 \times 10^4$ ）は<sup>51</sup>Crでラベルされ、様々な比で

F a s L形質転換体と混合された。37℃で4時間のインキュベーションの後、  
標的細胞からの<sup>51</sup>Crの特異的な放出が測定された。

初代肝細胞に対する可溶型F a s LやF a s L形質転換体の細胞障害活性  
は以下のように測定された。マウス肝細胞は11週齢の雌のC3H/Heのマウ  
5 ス（SLC，静岡から購入）から、アダチ等、Nature Genet. 11, 294-300, 1995に  
記載のとおり調製された。肝細胞（ $1 \times 10^5$ ）は0.03% I型コラーゲンで  
コートされた48穴のプレートに植えられ、5% FCSを含むDMEMで24時  
間培養された。肝細胞は、可溶型F a s LやF a s L形質転換体と一緒に37℃  
で22時間インキュベートされた。培地に放出されたGOTの濃度は和光化学社  
10 製のトランスアミナーゼCIIキットで測定された。

#### （4）免疫沈降とウェスタンブロッティング

F a s L形質転換体は10% FCSを含むPRMI1640培地で培養され、  
培地中のF a s Lと細胞溶解物が免疫沈降に続くウェスタンブロッティング  
で分析された。要約すると、細胞は、1% NP40、1 mM [p-アミノフェ  
15 ニル] メタンスルホニルフルオリドハイドロクロライド、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のペプ  
スタチン、および $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のロイペプチンを含むTBS中で氷上で30  
分インキュベーションすることにより溶解した。15,000 rpmで20分間遠  
心した後、免疫沈降の為に上清が集められた。 $4 \times 10^5$ 細胞の細胞溶解物  
（100  $\mu\text{l}$ ）や100  $\mu\text{l}$ の培地が4℃で45分間25  $\mu\text{l}$ のプロテインAセ  
20 ファロース4FFビーズ（ファルマシア社製）に前もって吸収され、次い  
で、10  $\mu\text{l}$ の抗F a s Lモノクローナル抗体（4H9）で修飾されたプロ  
テインAセファロースと4℃で一晩インキュベーションされた。ビーズは0.1

%NP 40を含むTBSで念入りに洗浄され、 $\beta$ メルカプトエタノールを含まない10  $\mu$ lのレミールサンプルバッファー (Laemmli's sample buffer) と懸濁された。サンプルは10-20%勾配ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、タンパク質は4℃、30Vで、15時間でPVDF膜(ミリポア社製)に転写された。FasLタンパク質はタナカ等、EMBO J., 14, 1129-1135, 1995に記載のとおり、抗FasLポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出された。

実施例で得られた結果は、以下のように表1、および図1～7に表された。

表1には、野生型と変異FasLを発現する形質転換体によるヒトFasLの可溶型の生産の結果が示された。

表1

構成	クローン	細胞障害活性(units/ml)
野生型	1 A 1 2	1 6 6 7
	1 F 1 0	5 5 6
D 4	4 1 B	< 2 0
	4 4 D	< 2 0
D 5	5 9 A	3 3
	5 - 2 - 2 1	6 7
D 6	6 1 B	4 0 0
	6 1 7 C	3 3 3

野生型、欠失変異体(D4, D5)、または点変異(D6)を発現するマウスWR19L細胞形質転換体クローンは20  $\mu$ MのBB2116の存在下で37℃で24時間培養され、次いで $4 \times 10^5$  細胞/ml濃度でBB2116なしで、37℃で24時間培養した。上清の細胞障害活性はW4細胞をターゲット細胞と

して用いてMTT分析を行なうことにより測定された。細胞障害活性の1ユニットは100  $\mu$ l中の $7.5 \times 10^4$ 細胞に対して極大の2分の1の細胞障害活性を付与する希釈率として定義された。

図1には、精製されたヒト可溶性Fasリガンドが示された。

- 5 (A)はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析の結果である。精製された可溶性ヒトFasL (6  $\mu$ g)が0.1% SDSの存在下10-20%勾配ポリアクリルアミドゲルで電気泳動により分析され、クマジーブリリアントブルーで染色された。サイズマーカーとして、分子量スタンダード(アマーシャム社、レインボウ<sup>TM</sup>着色タンパク質マーカー)が並行して流され
- 10 (M)、標準タンパク質のサイズがキロダルトン(kD)で示された。(B)は可溶性FasLの細胞障害活性を示したものである。 $7.5 \times 10^4$ マウスW4やヒトジャーカット細胞が、96穴マイクロタイタープレート中で提示した濃度の可溶性FasLと37℃で15時間インキュベーションされた。細胞生存率はMTT分析を用いて測定され、FasLなしで観察された生存率に対する
- 15 パーセンテージとして表された。

図2には欠失や点変異を有するFasL構築の概要図が示された。

- 野生型ヒトFasL (wild)、欠失(D4およびD5)、および点変異(D6)の構造が概要的に示された。CYT、TMおよびEXTは、それぞれヒトFasLの細胞内、膜貫通、および細胞外領域をあらわす。ヒトFasLの
- 20 切断部位のアミノ酸配列(EKQI)が示された。D4とD5の構築では、それぞれ、111-133番と128-131番のアミノ酸配列が欠失させられ、D6の構築では、Lys129がAlaに置換された。



図 3 には、ヒト F a s L 欠失変異による可溶型の F a s L の非放出が示された。

形質転換体におけるヒト F a s L の免疫的検出が示された。親株である WR 1 9 L 細胞 (WR 1 9 L) や、野生型のヒト F a s L (w i l d) や D 4、  
5 D 5 や D 6 変異体を発現する形質転換体が  $20 \mu\text{M}$  の B B 2 1 1 6 を含有する培地で  $4 \times 10^5$  細胞 / m l の濃度で 2 4 時間培養された。細胞は次いで B B 2 1 1 6 のはいていない培地に移され、さらに 2 4 時間インキュベートされた。形質転換体の細胞溶解物 (C) と上清 (S) は抗ヒト F a s L モノクローナル抗体 (4 H 9) と免疫沈降に供された。免疫沈降物は上記のとおり、ウ  
10 サギ抗ヒト F a s L 抗体を用いてウエスタンブロッティングで分析された。サイズマーカーとして分子量スタンダード (アマーシャム社製、レインボーマーカー) が並行して電気泳動され、標準タンパク質のサイズはキロダルトン (K D) で示された。

図 4 は細胞表面上での F a s L の発現を示す。野生型 F a s L (クローン  
15 1 A 1 2 と 1 F 1 0)、D 4 変異体 (クローン 4 1 B, 4 4 D)、D 5 変異体 (クローン 5 9 A と 5 - 2 - 2 1)、または D 6 変異体 (クローン 6 1 B および 6 1 7 C) を発現するマウス WR 1 9 L 細胞形質転換体が  $20 \mu\text{M}$  B B 2 1 1 6 あり (破線) となし (実線) の培地で 2 4 時間培養された。細胞はビオチン化された 4 H 9 抗ヒト F a s L 抗体と P E 標識ストレプトアビジンで染色さ  
20 れ、上記のとおり提示したフローサイトメトリーで分析された。

図 5 は膜結合型 F a s L の F a s を過剰に発現するマウス W 4 細胞の殺傷力を示す。

親のWR 1 9 L細胞（白丸）と、野生型（クローン 1 F 1 0、黒丸）、D4 変異体（クローン 4 4 D、白四角）を発現する細胞形質転換体の細胞障害活性が $^{51}\text{Cr}$ で標識したW 4 をターゲットとして用いて、上記のとおり提示したエフェクター／ターゲット（E／T）比で測定された。

- 5 図 6 はヒトジャーカット細胞に対する膜結合型 F a s L の増大された細胞障害活性を示す。親のマウスWR 1 9 L細胞（WR 1 9 L）と、野生型（クローン 1 F 1 0）、またはD4 変異体（クローン 4 4 D）を発現するその形質転換体が20  $\mu\text{M}$  B B 2 1 1 6 あり（黒丸）となし（白丸）で24時間培養された。細胞障害活性が $^{51}\text{Cr}$ で標識したヒトジャーカット細胞をターゲットとして用
- 10 いて、上記のとおり、提示したE／T比で測定された。

- 図 7 はマウス肝細胞の可溶型と膜結合型の F a s L の反応性を示す。（A）には肝細胞に対する可溶型 F a s L の細胞障害活性が示された。初代マウス肝細胞は10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のシクロヘキシミドがあり（黒丸）となし（白丸）でヒト可溶型 F a s L の提示した濃度で37℃で22時間インキュベーションされた。イン
- 15 キュベーションの後、キットを用いて上清のGOT濃度が測定された。合計のGOT活性は0.1%NP-40で細胞を溶解させた後で、細胞の溶解物中で測定された。特異的障害は合計のGOT活性に対する放出されたGOT濃度のパーセンテージとして表された。（B）にはマウス肝細胞に対する膜結合型 F a s L の細胞障害活性が示された。マウス肝細胞は、WR 1 9 L細胞（白
- 20 丸）、またはD4 変異体（クローンD 4 4、白四角）と、提示したE／T比で、37℃で22時間インキュベーションされた。インキュベーションの後、障害活性は上記のとおり測定された。（C）は可溶型 F a s L による膜結合型 F a s L

の細胞障害活性の阻害を示した。マウス肝細胞がE/T比2.0で、可溶型FasLが提示した濃度で存在して、D4変異体を発現するWR19L細胞形質転換体と一緒に37℃で22時間インキュベートされた。インキュベートの後、特異的障害活性が上記のとおり測定された。

#### 5 <ヒト可溶型Fasリガンドの精製>

本発明者は以前、構成的にヒトFasLを発現する安定な形質転換体(1A12 Cell)を確立した。形質転換体は細胞表面にFasLを発現して、また培地中にも機能を持った可溶型FasLを生産した(タナカ等、Nature Med. 2, 317-322, 1996)。可溶型ヒトFasLを精製するために、1A12細胞は5%のFCSを含むPRMI培地で培養され、FasLは抗FasL抗体(4H9)を固定したプロテインAセファロースで親和的に精製された。およそ200μgの精製されたFasLがコンディションドメディウム2000mlから得られた。図1aに提示したとおり、精製したFasLのポリアクリルアミドゲル電気泳動は分子量26,000に単一バンドを示し、これは活性化されたヒト末梢血リンパ球により生産される可溶型FasLに似ていた(タナカ等、EMBO J., 14, 1129-1135, 1995)。精製したFasLの細胞障害活性がFas発現マウスW4細胞をターゲットとして分析された時、それは $2 \times 10^7$  U/mgの比活性を有し、これは基本的にPichia Pastorisにより生産された組み換え可溶型FasLと同じであった(タナカ等、J. Immunol., 158, 2303-2309, 1997)。ヒトジャーカット細胞は内因性Fasを発現し、抗Fas抗体誘導アポトーシスに感受性がある(タカハシ等、Eur. J. Immunol., 23, 1935-1941, 1993)。可溶型FasLの細胞障害活性がジャーカット細胞を標的として分析され

たとき、非常に弱い活性を示した。すなわち、可溶型 F a s L の  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  が 15 時間でたった 30 % の細胞しか殺すことができず、ジャーカット細胞が、同じ条件で、可溶型 F a s L に対し、マウス W4 細胞より 1000 倍以上非感受性であることを示す。

#### 5 < F a s L の切断位置 >

精製された可溶型 F a s L の N 末端のアミノ酸配列を決定するために該タンパク質はポリアクリルアミド上で電気泳動で分離され、P V D F 膜に転写された。エドマン分解法による自動シーケンサーにおける精製された 26 k D a タンパク質の分析の結果、G l n - l l e - G l y - H i s - P r o - S e r - P r o  
10 - P r o の単一の配列が示された。この配列はヒト F a s L の 130 ~ 137 番のアミノ酸に正確に対応した。これらの結果から本発明者は、膜結合型として合成されたヒト F a s L は L y s - 129 と G l n - 130 の間で切断されて可溶型になると結論づけた。

#### < 切断されない F a s L を発現する細胞株の確立 >

15 切断されない F a s L を発現する形質転換体を確立するために、切断部位に欠失や点変異がある一連の発現プラスミドを構築した。D4 や D5 は、それぞれ、-19 ~ +4 と -2 ~ +2 のアミノ酸が欠失した欠失変異である。D6 は L y s 129 を A l a に置き換えた点変異を持っている。これらの変異した遺伝子はヒトエロンゲーションファクター (p E F) 1  $\alpha$  遺伝子のプロモーターの制御下に  
20 おかれ、マウス W R 19 L 細胞へ導入された。

変異 F a s L が切断されるか否かを調べるために、それぞれの形質転換体は、メタロプロテアーゼ阻害剤 B B 2116 を含有する培地中で 24 時間培養され、

次いで、阻害剤がはいっていない培地へ移された。それらを24時間培養した後、培養上清中のF a s L活性とF a s Lタンパク質が分析された。表1に示すとおり、本来の切断部位を持つF a s Lの形質転換体は高濃度で培地中に可溶型F a s Lを分泌した。切断部位における23アミノ酸欠失変異遺伝子形質転換体（CD4）は全くF a s L活性を示さず、4アミノ酸欠失変異形質転換体（CD5）も、ほとんど、細胞障害活性を生じなかった。一方、-1でのL y sからA l aへの点変異は依然F a s Lの可溶型を生じた。形質転換体の培養上清と細胞破砕物は、次いで、抗ヒトF a s Lモノクローナル抗体（4H9）で免疫沈降され、免疫沈降は抗ヒトF a s Lポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットティングで分析された。図2Bで示すとおり、それぞれのF a s L形質転換体から得られた細胞破砕物は32～35kDaの主要バンドを示し、それは欠失のサイズから予想されるものであった。野生型と点変異（D6）の上清は分子量26000の可溶型F a s Lを含むが、一方、可溶型F a s Lタンパク質は欠失変異を発現する形質転換体（CD4とCD5）の上清中では見られなかった。これらの結果は野生型とD6変異の上清中ではF a s L活性が検出され、D4とD5では検出されなかったことと一致する。

タンパク質切断に対する変異F a s Lの耐性を確かめるために、細胞表面でのF a s L発現をフローサイトメトリーで調べた。図4で示すとおり、BB2116の存在下で培養した場合、全ての形質転換体が細胞表面に高濃度のF a s Lを発現した。野生株や置換変異体を発現する形質転換体をBB2116なしで培養した場合、細胞表面でのF a s Lの発現濃度は著しく減少した（約10分の1）。一方、欠失変異の形質転換体（CD4およびCD5）は同じ

条件下で細胞表面からほとんど F a s L を失わなかった。これらの結果は F a s L の細胞外領域の切断部位の E K Q I の配列は膜結合型 F a s L の開裂に不可欠であることを示した。一方、- 1 位での単一置換変異は効果がないことは、- 1 位のアミノ酸 ( L y s ) は開裂に重要ではないことを示唆した。

#### 5 <膜結合型 F a s L の増大された細胞障害活性>

本発明者は次いで、可溶型 F a s L を生じない膜結合型 F a s L が機能を有するか否かを調べた。図 5 に示すとおり、開裂可能または開裂不可能 F a s L ( w t または D 4 変異体 ) を発現する形質転換体は W 4 細胞に対して同程度の細胞障害活性を示し、膜結合型 F a s L は活性があり、切断部位での 2 3 アミノ酸  
10 の欠失は F a s L が F a s に結合してアポトーシスを誘導する能力に影響しないことを示した。

次いで、標的としてジャーカット細胞を用いて、これらの形質転換体の細胞障害活性が調べられた。図 6 に示すとおり、非変異の F a s L を発現する形質転換体がエフェクターとして用いられた場合、細胞障害活性は非常に低かった。

15 一方、開裂できない F a s L を発現する D 4 形質転換体がエフェクターとして用いられた場合、それらは効率的にジャーカット細胞を殺傷した。ジャーカット細胞の膜結合型 F a s L への反応性は W 4 細胞に匹敵するか僅かに劣る。つまり、約 5 0 % の W 4 細胞が E / T 比 5 . 0 で特異的に殺傷されるのに対し、2 0 % 以上のジャーカット細胞が E / T 比 3 . 0 で殺傷される。これらの結果は、少なく  
20 ともヒトジャーカット細胞に対して、膜結合型 F a s L が可溶型 F a s L より潜在的な細胞障害性が強いことを示した。従って、非変異の F a s L を発現する形質転換体が B B 2 1 1 6 で前処理された場合、その細胞は開裂できない D 4 変異

体で観察されたのと同様な、ジャーカット細胞に対する強い細胞障害活性を示した（図6）。

- 膜結合型 F a s L の細胞障害活性が可溶性 F a s L のそれより強いことを確認するために、さらに本発明者はマウス初代培養肝細胞を標的として用いた。マウス肝細胞は F a s 受容体を発現し、シクロヘキシミドの存在下で、アゴニスティックな抗 F a s 抗体、J o 2 により殺される（ニ一等、Exp. Cell Res., 215, 332-337, 1994）。可溶型 F a s L が細胞障害のエフェクターとして用いられた場合、同様な結果が得られた。つまり、可溶型 F a s L は肝細胞に対してほとんど細胞障害活性を示さないが、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  のシクロヘキシミドがあれば細胞死がおこる（図7A）。一方、開裂することができない欠失変異 F a s L（D4）を発現する形質転換体をエフェクターとして用いると、シクロヘキシミドなしで効果的に肝細胞を殺す（図7B）。同様に、開裂できる F a s L（wt）を発現する形質転換体は弱い細胞障害活性を肝細胞に対して示すけれども、その細胞障害活性はそのエフェクター細胞を B B 2 1 1 6 で前処理することにより、大幅に増大する（データは省略する）。

#### <可溶型 F a s L の阻害効果>

- 上述したとおり、非変異の F a s L の形質転換体は膜結合型の F a s L を高濃度で発現する（図3）が、その細胞障害活性は低い（図6）。これらの結果は形質転換体により産生された可溶型 F a s L が細胞障害活性に対して阻害的に働くことを示唆した。この可能性を調べるために、肝細胞が様々な濃度の可溶型 F a s L で前処理され、肝細胞の F a s L の膜結合型（D4 変異体）に対する反応性が調べられた。図7Cに示すとおり、可溶型 F a s L は用量依存的に細胞障

害活性を阻害し、 $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ の可溶型FasLはE/T比2.0で細胞障害活性の半分を阻害するのに十分であった。

本発明において、ヒトFasLの可溶型はヒトFasL発現プラスミドにより形質転換されたマウスT細胞株で生産された。精製されたヒトFasLのN末端  
 5 アミノ酸配列の決定は可溶型ヒトFasLがLys129とGln130の間で開裂して、放出されることを明らかにした。FasLの切断部位近傍のアミノ酸配列(Glu-Lys-Gln-Ile)はヒト、ラット、およびマウスで観察され(タカハシ等、Int. Immunol., 6, 1567-1574, 1994)、そして切断部位近傍の  
 4~23アミノ酸の欠失は可溶型ヒトFasLの上清中への放出を阻害した。こ  
 10 の結果は、FasLを認識して分解するプロテアーゼにとって、切断部位近傍の該アミノ酸配列が重要であることを示唆する。

II型の膜タンパク質として合成されるTNFファミリー構成員のなかで、TNF $\alpha$ とCD40リガンドは可溶型になることが示された(ペレ等、Cell, 63, 251-258, 1990; ピエトラベール等、J. Biol. Chem., 271, 5965-5967, 1996)。  
 15 TNF $\alpha$ とCD40リガンドの切断部位は、それぞれLeu-Ala-Gln-Ala/Val-Arg-Ser-Ser、およびAsn-Ser-Phe-Glu/Met-Gln-Lys-Glyである(アガーウォール等、J. Biol. Chem., 260, 2345-2354, 1985; グラフト等、Eur. J. Immunol., 25, 1749-1754, 1995)。これらの配列はFasL(Ser-Leu-Glu-Lys/Gln-  
 20 Ile-Gly-His)と明白な類似性は示さず、TNF $\alpha$ 、FasL、およびCD40リガンドは異なった基質特異性をもった別個のプロテアーゼにより分解されることを示す。これに対し、FasLとTNF $\alpha$ の放出はどちらもマ



- トリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 阻害剤 (BB 2116) により阻害され (ジーリング等、Nature 370, 555-557, 1994 ; マックジーハム等、Nature, 370, 558-561, 1994 ; モーラー等、Nature, 370, 218-220, 1994 ; タナカ等、Nature Med. 2, 317-322, 1996 )、TNF $\alpha$ とFasLを開裂するプロ
- 5 テアーゼは似た活性部位を有することを示唆する。最近、TNF $\alpha$ を分解するプロテアーゼ (TACE, TNF $\alpha$ 変換酵素) が同定され A Disintegrin And Metalloproteaseドメインを有する膜タンパク質であるADAMファミリープロ
- 10 テアーゼの構成員であることが示された (ブラック等、Nature 385, 729-733, 1997 ; モス等、Nature, 385, 733-736, 1997) 。今まで、このファミリーの10以
- 15 上が知られている (ハワード等、Biochem. J., 1996 ; ウォルフスバーク等、Develop. Biol., 169, 378-383, 1995 ; ヤガミ等、Nature, 377, 652-6, 1995) 。あるものは精巣や筋肉で特異的に発現して、特異的な機能を有しているが、これに対し他のものはむしろ至るところで発現し、機能は不明である。FasLを切断するプロテアーゼもADAMファミリープロテアーゼの一員であるようだ。
- 20 TNF $\alpha$ 切断部位近傍の配列を有する12アミノ酸ペプチドはTACEを特定し、それを精製するためにうまく用いられた (ブラック等、Nature 385, 729-733, 1997 ; モス等、Nature, 385, 733-736, 1997) 。この研究で明らかにされたヒトFasLの切断部位の情報により本発明者はFasLの開裂に関与するプロテアーゼを特定するのに用いるペプチド基質を設計できる。
- 25 TNF $\alpha$ とCD40リガンドで示されたとおり (ペレ等、Cell, 63, 251-258, 1990 ; ピエトラベール等、Eur. J. Immunol., 26, 725-728, 1996 )、膜結合型FasLは機能を有しており、FasLはその機能を発揮するのに細胞内に

入る必要はないことは確実である。F a s LのF a sへの結合はF A D Dや  
F L I C Eのようないくつかのシグナル要素とF a s受容体を含むD I S C  
(D e a t h - I n d u c i n g S i g n a l i n g C o m p l e x)の形  
成を誘導し、細胞を殺す。本発明者はある細胞は可溶型および膜結合型F a s L  
5 に異なった反応性を有することを見出した。過剰にF a sを発現するマウスW 4  
細胞は可溶型のF a s Lで効率的に殺されるが、適当な濃度の内因性F a sを発  
現するヒトジャーカット細胞やマウス初代培養肝細胞は可溶型F a s Lに耐性で  
ある。一方、ジャーカット細胞と肝細胞は効果的に膜結合型F a s Lで殺さ  
れる。この現象はどのように説明できるであろうか。T N Fがレセプターに結合  
10 した場合、そのT N F / T N Fレセプター複合体は、インターナライズし、分解  
され、レセプターのダウンレギュレーションを引き起こす(ツジモト等、Pro.  
Nat'l. Acad. Sci., 82, 7626-7630, 1985; ワタナベ等、J. Biol. Chem., 263, 10262-  
10266, 1988)。同様なインターナライゼーションと分解がF a s L / F a s系でも  
生じるのかもしれない。可溶型F a s L / F a s複合体は容易にインターナライ  
15 ズするかもしれない。膜結合型F a s LとF a sのインターナライゼーションは遅  
延するようだ。最近、メデマ等(メデマ等、EMBO J., 16, 2794-2804, 1997)は、  
F a s誘導アポトーシスの最も早いシグナル伝達分子の1つであるF L I C Eは  
細胞質膜でD I S C中のみで活性化されるに違いないと報告した。F a s受容体  
が可溶型F a s Lにより迅速にインターナライズされる場合、膜結合型F a s L  
20 により誘導されるD I S Cは長くとどまりF L I C Eを活性化するのに対し  
て、可溶型F a s LによるF L I C Eの活性化は非常に少ない。W 4細胞は  
ジャーカット細胞や肝細胞よりF a sを数多く発現するため、弱いシグナルの合

計は細胞を殺すのに十分である。さらに可溶型 F a s L が F a s 受容体の急速なダウンレギュレーションを起こしたら、膜結合型 F a s L の細胞障害活性を阻害するだろう。本発明者は、F a s が誘導するアポトーシスを協調して刺激する（膜結合性 F a s L とは）別の膜分子の存在の可能性を除外することはできないが、上記の説明は可能性のある説明であると考える。

本発明者は、最近ヒト H B V のエンベロープ遺伝子を肝臓で発現するトランスジェニックマウスがエンベロープ類蛋白を認識する C T L クローンを少量（ $3 \times 10^6$  細胞）注射されたとき、マウスは肝炎を起こして F a s 依存性態様で死んだことを示した（コンドウ等、Nature Med., 3, 409-413, 1997）。一方、同様の効果を示すには大量の組み換え可溶型 F a s L が必要であった（タナカ等、158, 2303-2309, 1997）。これらの結果は膜結合型 F a s L がインビボで機能性 F a s L であるという上述の結果から説明される。同様の発見が、前に T N F  $\alpha$  で報告された、つまり、可溶型 T N F でなく膜結合型 T N F  $\alpha$  が細胞死を起こす T N F タイプ II 受容体を活性化し（グレル等、Cell, 83, 793-802, 15 1995）、可溶型 T N F でなく膜結合型 T N F  $\alpha$  がリーシュマニアに対する防御活性化に関与することが示された（シベックとウィリー、J. Exp. Med., 174, 755-759, 1991）。最近、サロルザノ等がメタロプロテアーゼ阻害剤（B B 2 1 1 6）がマウスにおける C o n A 誘導肝炎を起こし得ることが示された（サロルザノ等、J. Immunol., 158, 414-419, 1997）。C o n A 活性化 T 細胞からの T N F 20 と F a s L の放出の抑制はより多くの肝細胞の細胞死を起こし得る。

本発明者は、可溶型 F a s L を発見したとき、F a s 受容体は多くの組織で発現されるので可溶型 F a s L が全身性組織破壊を引き起こすと考えた（タナ

カ等、 Nature Med. 2, 317-322, 1996 ; タナカ等、 EMBO J., 14, 1129-1135, 1995)。しかし可溶型でなく膜結合型 F a s L に細胞障害活性が見つかったので F a s L 誘導細胞死は局所的な反応であることが示唆される。免疫系の監視では、細胞障害性リンパ球がウイルス感染細胞や癌細胞を認識し、活性化される。細胞表面で発現した F a s L は標的細胞を局所的に殺し、放出によりダウンレギュレートされる。この機構が無関係な健康な細胞を殺さないことを保証する。血清中に可溶型のヒト F a s L を保有するヒト疾患全てではなく、一部のみが肝炎と好中球減少症を示したことは（タナカ等、 Nature Med. 2, 317-322, 1996）、可溶型 F a s L そのものは普通の細胞に対して無毒である事と一致する。細胞が例えば F a s 発現の正の調節により F a s 誘導アポトーシスに感作させれば、これら細胞は可溶型 F a s L で殺されるだろう。

F a s L は目や精巣で構成的に発現され、免疫回避に対するその役目が示唆される（ベルグロ等、 Nature 377, 630-632, 1995 ; グリフィス等、 Science, 270, 1189-1192, 1995）。この現象を応用して、いくつかのグループは最近移植で免疫の攻撃から逃げるために F a s L を発現しようとした。ある報告では、F a s L を発現する筋芽細胞と共に移植したランゲルハンス  $\beta$  細胞は長く生き残った（ロー等、 Science, 273, 109-112, 1996）が、一方、他の報告では、F a s L を発現する  $\beta$  細胞または腫瘍細胞は好中球を増やし、F a s L を発現しない細胞より速やかに殺された（アリソン等、 Proc. Natl. Acad. Sci., 94, 3943-3947, 1997 ; セイノ等、 Nature Medicine, 3, 165-170, 1997）。以前、クラブ等は可溶型 T N F を生産する腫瘍細胞が炎症をおこすが、一方、膜結合型 T N F を生産する細胞は炎症をおこさないことを報告した（クラブ等、 J. Immunol., 149, 2076

-2081, 1992)。これにより、移植片で膜結合型F a s Lだけを産生する様に設計されたF a s Lを発現することは興味深いかもしれない。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、F a s アンタゴニストとして機能する可溶性F a s リガンド、

- 5 細胞障害活性に優れた新規な膜結合性F a s リガンド誘導体および該ペプチドをコードするDNAが提供され、F a s L誘導アポトーシスが関与する疾患の、治療および予防等に寄与することができる。

## 請求の範囲

1. プロテアーゼ抵抗性を有する新規F a s リガンド誘導体。
2. 天然型ヒトF a s リガンドのN末端から129～130番のアミノ酸が欠失または置換され、かつ、111～128番、131～133番のアミノ酸のうち少なくとも一つが欠失または置換されたアミノ酸配列を含有する新規F a s リガンド誘導体。
3. 天然型ヒトF a s リガンドのN末端から8～69番のアミノ酸が欠失され、かつ129～130番のアミノ酸が欠失または置換され、かつ、111～128番、131～133番のアミノ酸のうち少なくとも一つが欠失または置換されたアミノ酸配列を含有する新規F a s リガンド誘導体。
4. 配列番号1または2に記載したアミノ酸配列を含有する新規F a s リガンド誘導体。
5. 請求項1～4のいずれかに記載の新規F a s リガンド誘導体をコードするDNA。
6. 可溶型F a s リガンドを含有するアポトーシス調節剤。
7. 請求項1、2、3、4または6に記載のF a s リガンド誘導体またはアポトーシス調節剤を投与することを特徴とするF a s リガンド誘導アポトーシスが関与する疾患の予防・治療方法。

Fig. 1

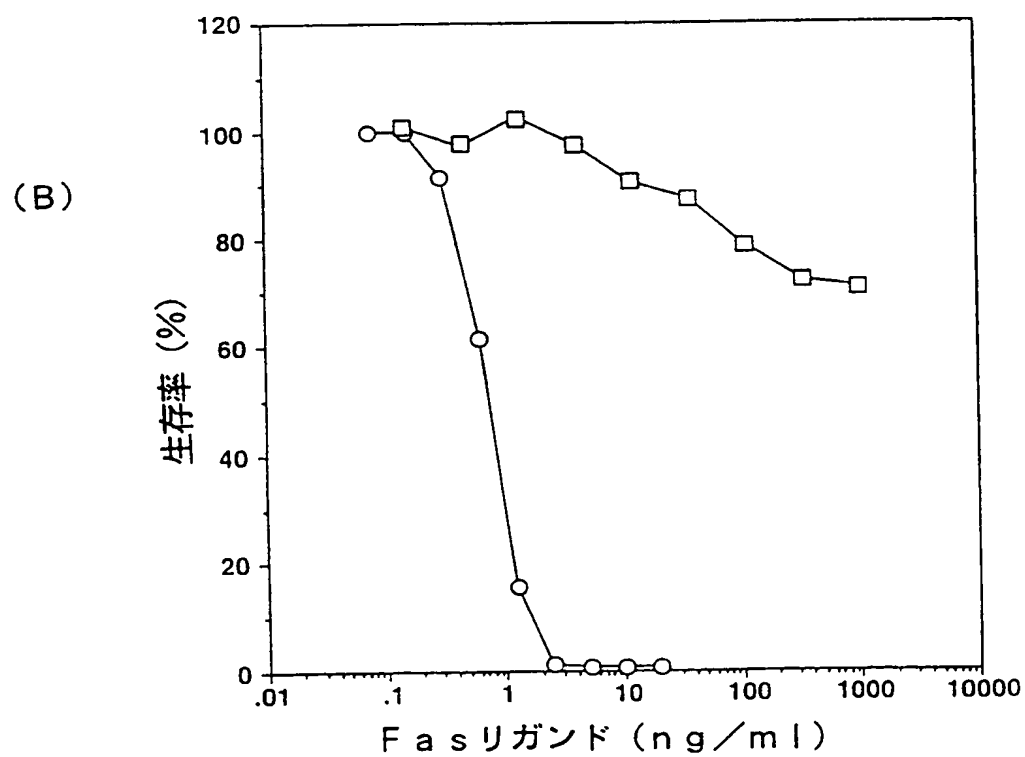
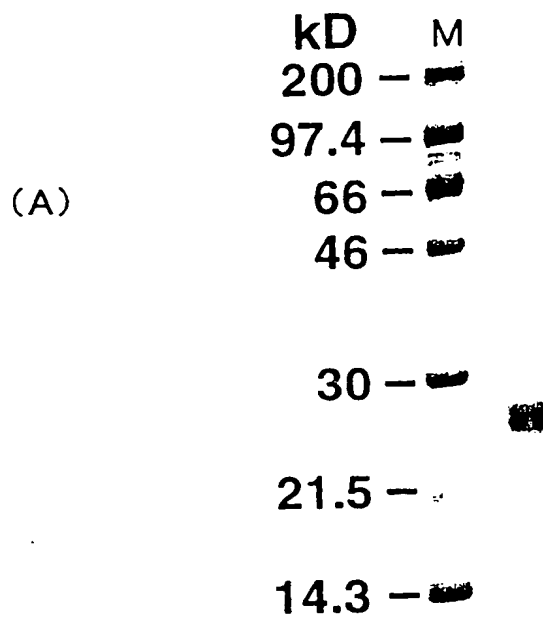
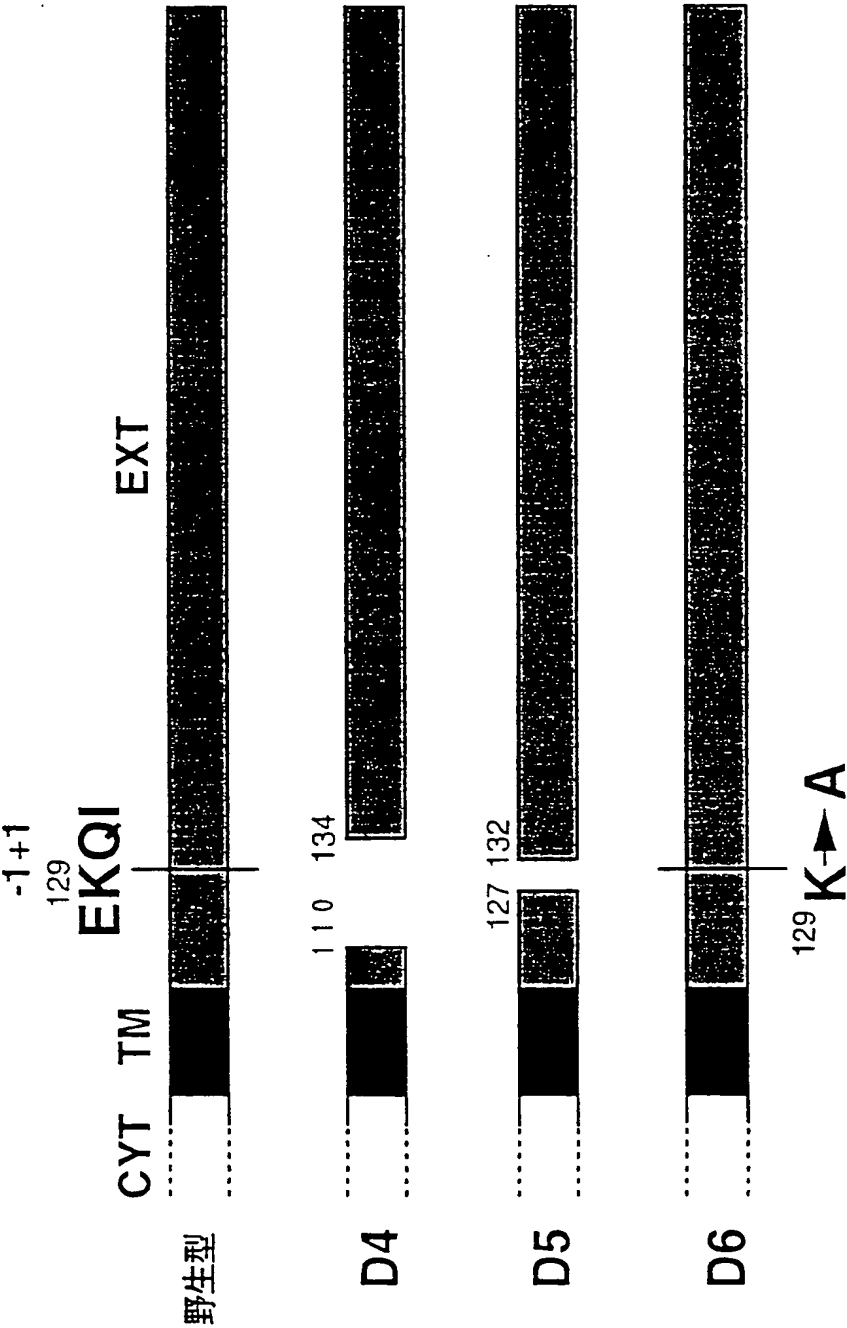


Fig.2





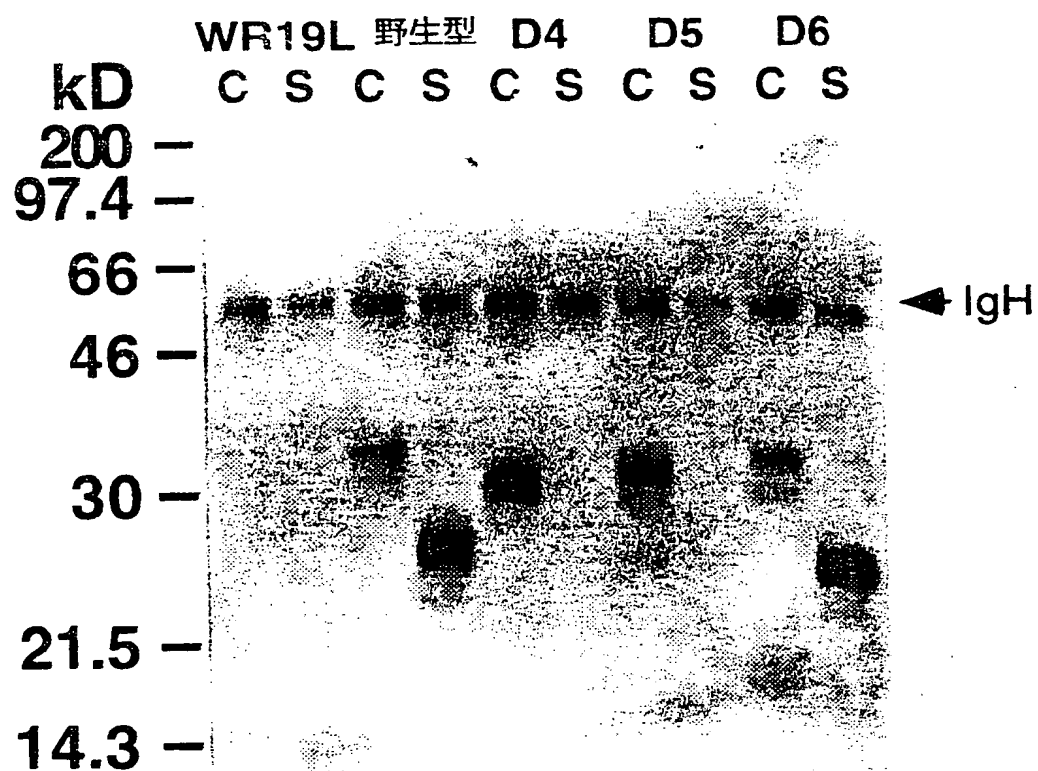
*Fig.3*

Fig. 4

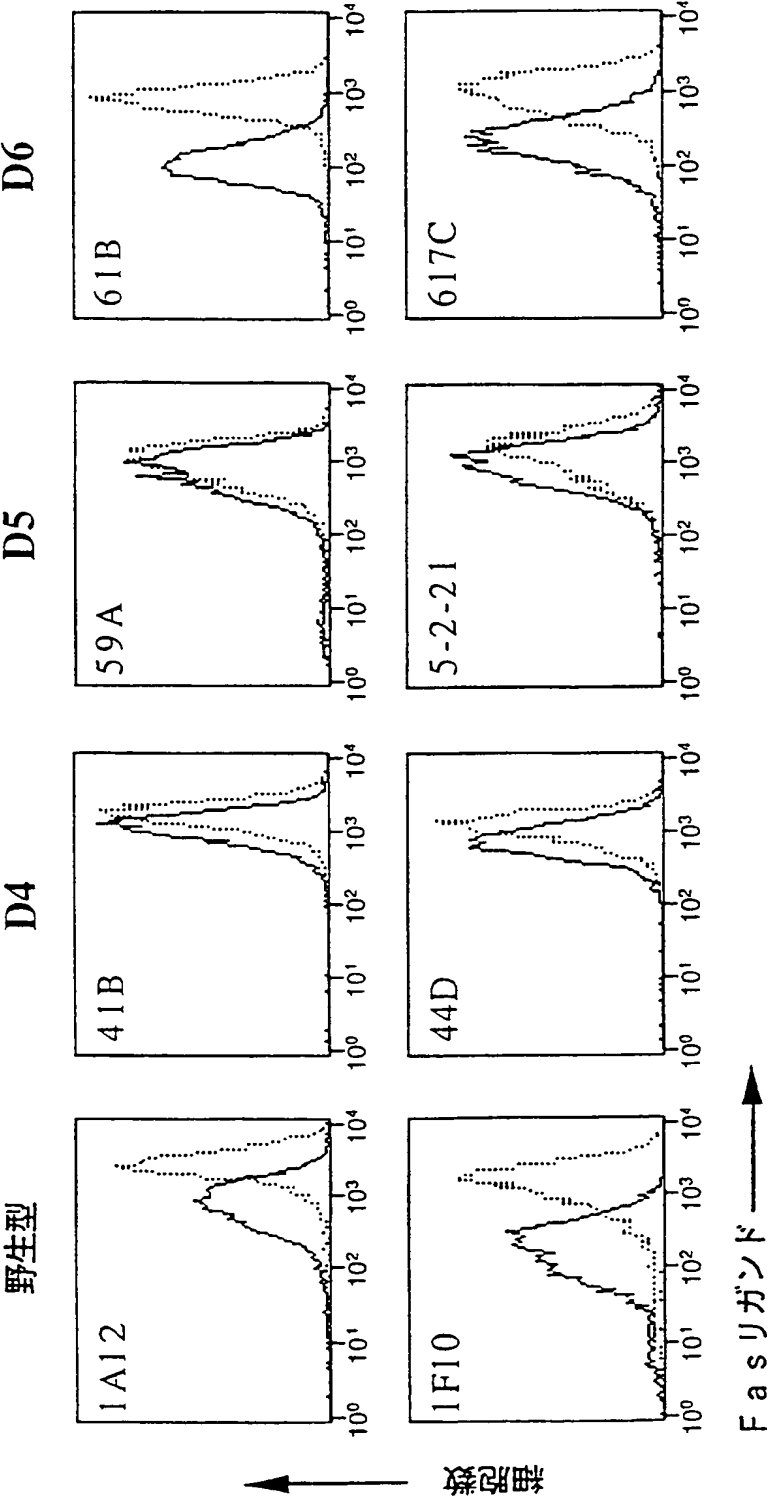


Fig. 5

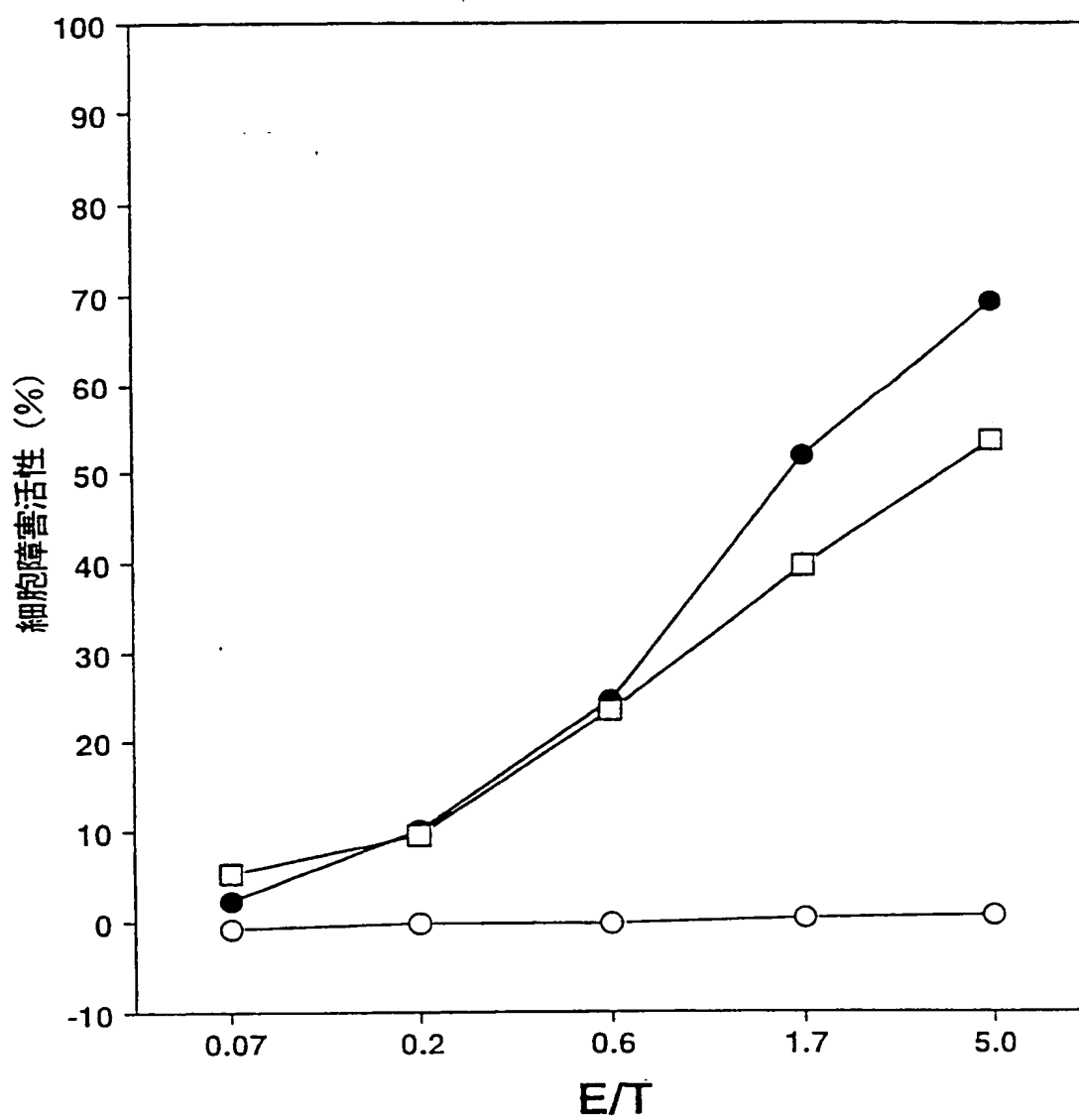


Fig.6

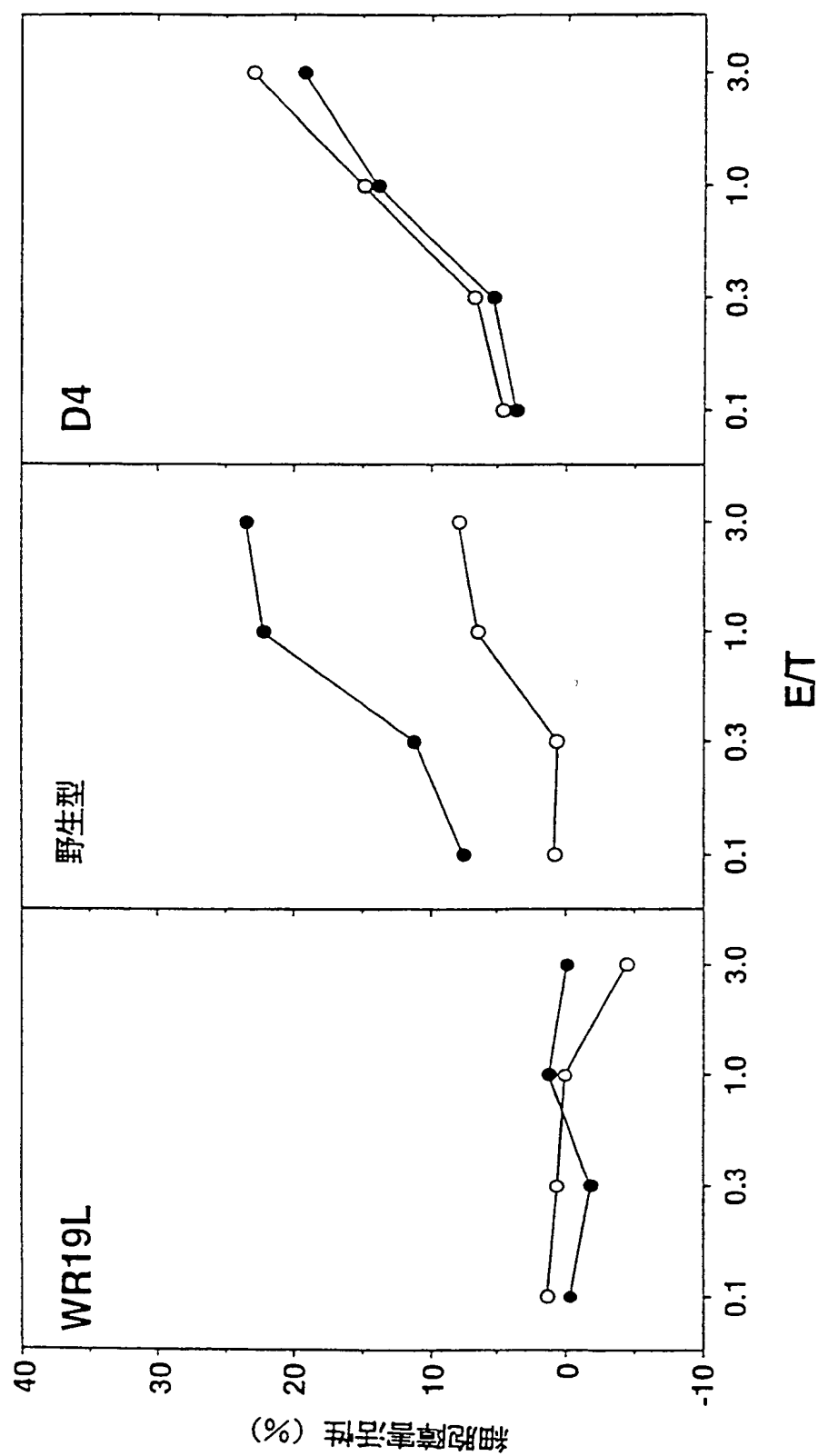
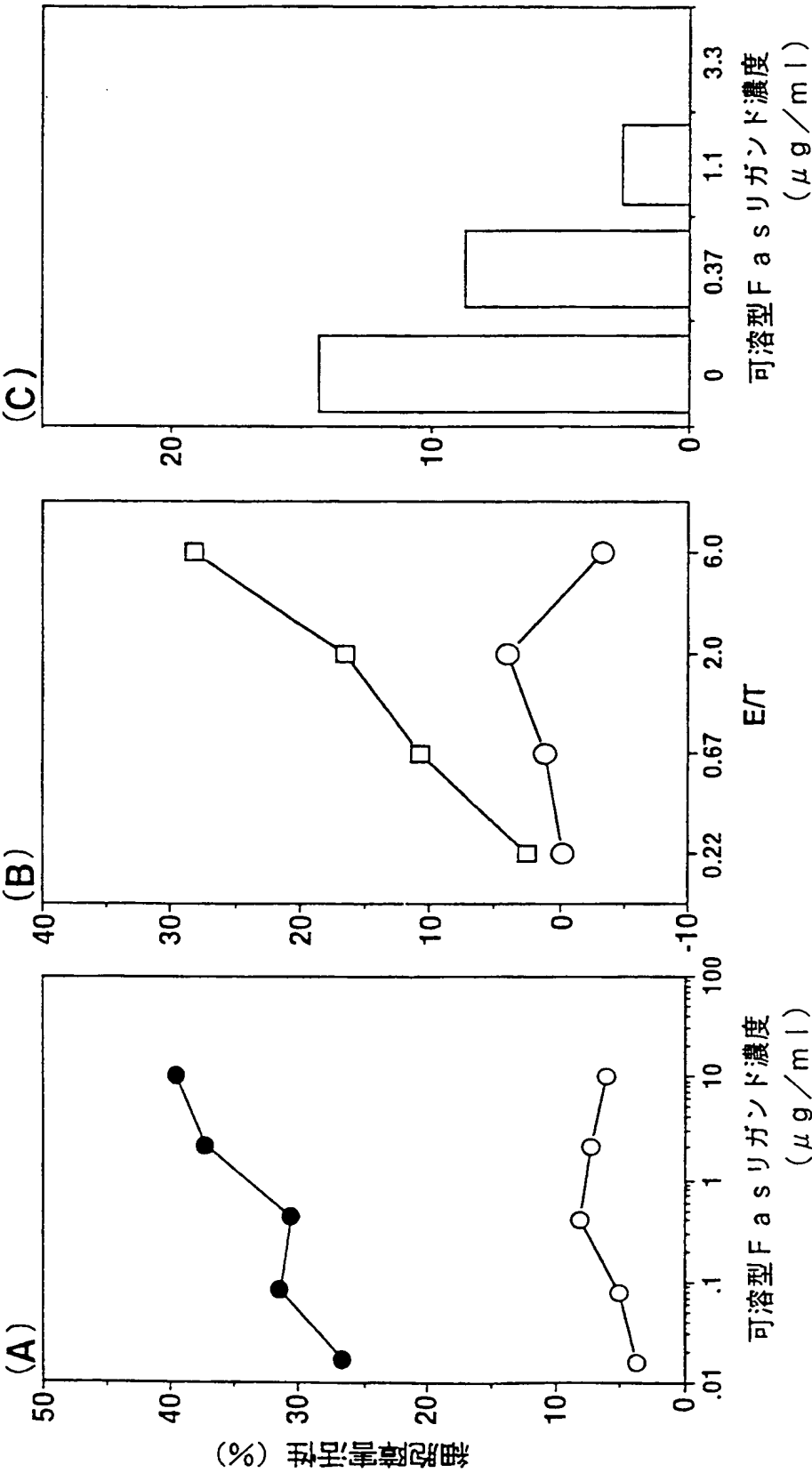


Fig.7



## 配列表

## Sequence Listing

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 258

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 1

Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val

1 5 10 15

Asp Ser Ser Ala Ser Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Thr Val Leu

20 25 30

Pro Cys Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg Pro Gly Gln Arg Arg Pro

35 40 45

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro

50 55 60

Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu Lys Lys Arg Gly

65 70 75

Asn His Ser Thr Gly Leu Cys Leu Leu Val Met Phe Phe Met Val

80 85 90

Leu Val Ala Leu Val Gly Leu Gly Leu Gly Met Phe Gln Leu Phe

95 100 105

His Leu Gln Lys Glu Pro Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu  
110 115 120

Arg Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met  
125 130 135

Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly  
140 145 150

Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu  
155 160 165

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn  
170 175 180

Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr  
185 190 195

Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys  
200 205 210

Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val  
215 220 225

Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu  
230 235 240

Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu  
245 250 255

Tyr Lys Leu  
258

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 277

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 2

Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val

1 5 10 15

Asp Ser Ser Ala Ser Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Thr Val Leu

20 25 30

Pro Cys Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg Pro Gly Gln Arg Arg Pro

35 40 45

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro

50 55 60

Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu Lys Lys Arg Gly

65 70 75

Asn His Ser Thr Gly Leu Cys Leu Leu Val Met Phe Phe Met Val

80 85 90

Leu Val Ala Leu Val Gly Leu Gly Leu Gly Met Phe Gln Leu Phe

95 100 105

His Leu Gln Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu Ser Thr Ser Gln

110 115 120

Met His Thr Ala Ser Ser Leu Gly His Pro Ser Pro Pro Pro Glu



125	130	135
Lys Lys Glu Leu Arg Lys Val Ala His Leu Thr Gly Lys Ser Asn		
140	145	150
Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val		
155	160	165
Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val Ile Asn		
170	175	180
Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly		
185	190	195
Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg		
200	205	210
Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met		
215	220	225
Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr		
230	235	240
Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val		
245	250	255
Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr		
260	265	270
Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu		
275	277	

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 281

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 3

Met Gln Gln Pro Phe Asn Tyr Pro Tyr Pro Gln Ile Tyr Trp Val

1 5 10 15

Asp Ser Ser Ala Ser Ser Pro Trp Ala Pro Pro Gly Thr Val Leu

20 25 30

Pro Cys Pro Thr Ser Val Pro Arg Arg Pro Gly Gln Arg Arg Pro

35 40 45

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro

50 55 60

Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Leu Pro Pro Leu Lys Lys Arg Gly

65 70 75

Asn His Ser Thr Gly Leu Cys Leu Leu Val Met Phe Phe Met Val

80 85 90

Leu Val Ala Leu Val Gly Leu Gly Leu Gly Met Phe Gln Leu Phe

95 100 105

His Leu Gln Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu Ser Thr Ser Gln

110 115 120

Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu Ala Gln Ile Gly His Pro Ser

125	130	135
Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg Lys Val Ala His Leu Thr		
140	145	150
Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr		
155	160	165
Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly		
170	175	180
Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val		
185	190	195
Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser His Lys		
200	205	210
Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met		
215	220	225
Glu Gly Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala		
230	235	240
Arg Ser Ser Tyr Leu Gly Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp		
245	250	255
His Leu Tyr Val Asn Val Ser Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu		
260	265	270
Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu Tyr Lys Leu		
275	280 281	

<210> 4

<211> 774

<212> DNA to RNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

ATG CAG CAG CCC TTC AAT TAC CCA TAT CCC CAG ATC TAC TGG GTG 45  
GAC AGC AGT GCC AGC TCT CCC TGG GCC CCT CCA GGC ACA GTT CTT 90  
CCC TGT CCA ACC TCT GTG CCC AGA AGG CCT GGT CAA AGG AGG CCA 135  
CCA CCA CCA CCG CCA CCG CCA CCA CTA CCA CCT CCG CCG CCG CCG 180  
CCA CCA CTG CCT CCA CTA CCG CTG CCA CCC CTG AAG AAG AGA GGG 225  
AAC CAC AGC ACA GGC CTG TGT CTC CTT GTG ATG TTT TTC ATG GTT 270  
CTG GTT GCC TTG GTA GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CAG CTC TTC 315  
CAC CTA CAG AAG GAG CCC AGT CCA CCC CCT GAA AAA AAG GAG CTG 360  
AGG AAA GTG GCC CAT TTA ACA GGC AAG TCC AAC TCA AGG TCC ATG 405  
CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACC TAT GGA ATT GTC CTG CTT TCT GGA 450  
GTG AAG TAT AAG AAG GGT GGC CTT GTG ATC AAT GAA ACT GGG CTG 495  
TAC TTT GTA TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT CAA TCT TGC AAC 540  
AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG GTC TAC ATG AGG AAC TCT AAG TAT 585  
CCC CAG GAT CTG GTG ATG ATG GAG GGG AAG ATG ATG AGC TAC TGC 630  
ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC CGC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTG 675  
TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAT CAT TTA TAT GTC AAC GTA TCT GAG 720  
CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG GAA TCT CAG ACG TTT TTC GGC TTA 765

TAT AAG CTC

774

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 831

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 5

ATG CAG CAG CCC TTC AAT TAC CCA TAT CCC CAG ATC TAC TGG GTG 45  
GAC AGC AGT GCC AGC TCT CCC TGG GCC CCT CCA GGC ACA GTT CTT 90  
CCC TGT CCA ACC TCT GTG CCC AGA AGG CCT GGT CAA AGG AGG CCA 135  
CCA CCA CCA CCG CCA CCG CCA CCA CTA CCA CCT CCG CCG CCG CCG 180  
CCA CCA CTG CCT CCA CTA CCG CTG CCA CCC CTG AAG AAG AGA GGG 225  
AAC CAC AGC ACA GGC CTG TGT CTC CTT GTG ATG TTT TTC ATG GTT 270  
CTG GTT GCC TTG GTA GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CAG CTC TTC 315  
CAC CTA CAG AAG GAG CTG GCA GAA CTC CGA GAG TCT ACC AGC CAG 360  
ATG CAC ACA GCA TCA TCT TTG GGC CAC CCC AGT CCA CCC CCT GAA 405  
AAA AAG GAG CTG AGG AAA GTG GCC CAT TTA ACA GGC AAG TCC AAC 450  
TCA AGG TCC ATG CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACC TAT GGA ATT GTC 495  
CTG CTT TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAG GGT GGC CTT GTG ATC AAT 540  
GAA ACT GGG CTG TAC TTT GTA TAT TCC AAA GTA TAC TTC CGG GGT 585  
CAA TCT TGC AAC AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG GTC TAC ATG AGG 630  
AAC TCT AAG TAT CCC CAG GAT CTG GTG ATG ATG GAG GGG AAG ATG 675

ATG AGC TAC TGC ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC CGC AGC AGC TAC 720  
CTG GGG GCA GTG TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAT CAT TTA TAT GTC 765  
AAC GTA TCT GAG CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG GAA TCT CAG ACG 810  
TTT TTC GGC TTA TAT AAG CTC 831

<210> 6

<211> 843

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

ATG CAG CAG CCC TTC AAT TAC CCA TAT CCC CAG ATC TAC TGG GTG 45  
GAC AGC AGT GCC AGC TCT CCC TGG GCC CCT CCA GGC ACA GTT CTT 90  
CCC TGT CCA ACC TCT GTG CCC AGA AGG CCT GGT CAA AGG AGG CCA 135  
CCA CCA CCA CCG CCA CCG CCA CCA CTA CCA CCT CCG CCG CCG CCG 180  
CCA CCA CTG CCT CCA CTA CCG CTG CCA CCC CTG AAG AAG AGA GGG 225  
AAC CAC AGC ACA GGC CTG TGT CTC CTT GTG ATG TTT TTC ATG GTT 270  
CTG GTT GCC TTG GTA GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CAG CTC TTC 315  
CAC CTA CAG AAG GAG CTG GCA GAA CTC CGA GAG TCT ACC AGC CAG 360  
ATG CAC ACA GCA TCA TCT TTG GAG GCA CAA ATA GGC CAC CCC AGT 405  
CCA CCC CCT GAA AAA AAG GAG CTG AGG AAA GTG GCC CAT TTA ACA 450  
GGC AAG TCC AAC TCA AGG TCC ATG CCT CTG GAA TGG GAA GAC ACC 495  
TAT GGA ATT GTC CTG CTT TCT GGA GTG AAG TAT AAG AAG GGT GGC 540

CTT GTG ATC AAT GAA ACT GGG CTG TAC TTT GTA TAT TCC AAA GTA 585  
TAC TTC CGG GGT CAA TCT TGC AAC AAC CTG CCC CTG AGC CAC AAG 630  
GTC TAC ATG AGG AAC TCT AAG TAT CCC CAG GAT CTG GTG ATG ATG 675  
GAG GGG AAG ATG ATG AGC TAC TGC ACT ACT GGG CAG ATG TGG GCC 720  
CGC AGC AGC TAC CTG GGG GCA GTG TTC AAT CTT ACC AGT GCT GAT 765  
CAT TTA TAT GTC AAC GTA TCT GAG CTC TCT CTG GTC AAT TTT GAG 810  
GAA TCT CAG ACG TTT TTC GGC TTA TAT AAG CTC 843

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04187

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, A61K38/17, A61K38/57, C07K14/525

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC.

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, A61K38/17, A61K38/57, C07K14/525

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SeissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TANAKA, M. et al., "Fas ligand in human serum", Nature Medicine (1996) Vol. 2, No. 3 p.317-322	1, 5, 6
A		2, 3, 4
X	JP, 9-124510, A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 13 May, 1997 (13. 05. 97) (Family: none)	1, 5, 6
A		2, 3, 4
A	TAKAHASHI, T. et al., "Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity", International Immunology (1994) Vol. 6, No. 10 p.1567-1574	2, 3, 4
P, X	TANAKA, M. et al., "Down regulation of Fas ligand by shedding", Nature Medicine (1998) Vol. 4, No. 5 p.31-36	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
8 December, 1998 (08. 12. 98)

Date of mailing of the international search report  
15 December, 1998 (15. 12. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04187

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 7 pertains to methods for treatment of the human or animal body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/12, A61K 38/17, A61K 38/57, C07K 14/525

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/12, A61K 38/17, A61K 38/57, C07K 14/525

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SeissProt/PIR/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X,	TANAKA, M. et al. "Fas ligand in human serum", Nature Medicine (1996) 第2巻, 第3号 p.317-322	1, 5, 6
A		2, 3, 4
X	JP, 9-124510, A (住友電気工業株式会社) 13.5月.1997 (13.05.97)	1, 5, 6
A	パテントファミリーなし	2, 3, 4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.12.98

国際調査報告の発送日

15.12.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TAKAHASHI, T. et al. "Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity", International Immunology (1994) 第6巻, 第10号 p. 1567-1574	2, 3, 4
P, X	TANAKA, M. et al. "Down regulation of Fas ligand by shedding", Nature Medicine (1998) 第4巻, 第5号 p. 31-36	1 - 6

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 06 JAN 2000

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 PCT 79	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 98/04187	国際出願日 (日.月.年) 17. 09. 98	優先日 (日.月.年) 17. 09. 97
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C12N 15/12, A61K 38/17, A61K 38/57, C07K 14/525		
出願人 (氏名又は名称) 持田製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で          ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 06. 04. 99	国際予備審査報告を作成した日 09. 12. 99	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)  六笠 紀子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9735

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

## Ⅲ. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 7

理由：

☒ この国際出願又は請求の範囲 7 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

人の身体の治療による処置方法

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範囲 7 について、国際調査報告が作成されていない。

2. スクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	2 - 6	有
	請求の範囲	1	無
進歩性 (IS)	請求の範囲	2, 3, 4	有
	請求の範囲	1, 5, 6	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1 - 6	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

引用文献1 : TANAKA, M. et al. "Fas ligand in human serum",  
Nature Medicine (1996) 第2巻, 第3号 p.317-322

引用文献2 : TAKAHASHI, T. et al. "Human Fas ligand: gene structure,  
chromosomal location and species specificity",  
International Immunology (1994) 第6巻, 第10号 p.1567-1574

## 請求の範囲 1、5

引用文献1には、メタロプロテアーゼによって膜から切断された可溶性Fasリガンドが記載されている。

引用文献2には、ヒトのFasリガンドのcDNA配列及びアミノ酸配列が記載されている。

ここで、引用文献1に記載の上記可溶性Fasリガンドは、これ以上メタロプロテアーゼによって切断を受けないことから、プロテアーゼ抵抗性であるといえる。

従って、請求の範囲1に記載されたリガンド誘導体は引用文献1に記載されているものと認められる。

また、上記リガンド誘導体をコードするDNAの配列は引用文献2に記載された配列を基に周知の手法を用いて当業者が容易に決定し得たものと認める。

よって、請求の範囲5に係る発明は引用文献1及び2の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。

## 請求の範囲 6

引用文献2には、可溶性Fasリガンドがアポトーシスを介してヒトの様々な病気に関与することが記載されているから、該リガンドをアポトーシスの調節剤として使用することは当業者が容易に想到し得たものと認める。



PCT

EP



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)

[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 PCT79	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P98/04187	国際出願日 (日.月.年) 17.09.98	優先日 (日.月.年) 17.09.97
出願人(氏名又は名称) 持田製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

#### 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲 7 は、人又は動物の身体の治療による処置方法であるから、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係わるものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/12, A61K 38/17, A61K 38/57, C07K 14/525

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/12, A61K 38/17, A61K 38/57, C07K 14/525

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
SeissProt/PIR/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X,  A	TANAKA, M. et al. "Fas ligand in human serum", Nature Medicine (1996) 第2巻, 第3号 p.317-322	1, 5, 6  2, 3, 4
X  A	JP, 9-124510, A (住友電気工業株式会社) 13.5月.1997 (13.05.97) パテントファミリーなし	1, 5, 6  2, 3, 4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.12.98

国際調査報告の発送日

15.12.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TAKAHASHI, T. et al. "Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity", International Immunology (1994) 第6巻, 第10号 p.1567-1574	2, 3, 4
P, X	TANAKA, M. et al. "Down regulation of Fas ligand by shedding", Nature Medicine (1998) 第4巻, 第5号 p.31-36	1 - 6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04187

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 7 pertains to methods for treatment of the human or animal body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04187

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, A61K38/17, A61K38/57, C07K14/525

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, A61K38/17, A61K38/57, C07K14/525

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SeissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TANAKA, M. et al., "Fas ligand in human serum", Nature Medicine (1996) Vol. 2, No. 3 p.317-322	1, 5, 6
A		2, 3, 4
X	JP, 9-124510, A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), 13 May, 1997 (13. 05. 97) (Family: none)	1, 5, 6
A		2, 3, 4
A	TAKAHASHI, T. et al., "Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity", International Immunology (1994) Vol. 6, No. 10 p.1567-1574	2, 3, 4
P, X	TANAKA, M. et al., "Down regulation of Fas ligand by shedding", Nature Medicine (1998) Vol. 4, No. 5 p.31-36	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
8 December, 1998 (08. 12. 98)

Date of mailing of the international search report  
15 December, 1998 (15. 12. 98)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

29 April 1999 (29.04.99)

International application No.

PCT/JP98/04187

Applicant's or agent's file reference

PCT79

International filing date (day/month/year)

17 September 1998 (17.09.98)

Priority date (day/month/year)

17 September 1997 (17.09.97)

Applicant

NAGATA, Shigekazu et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

06 April 1999 (06.04.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Sean Taylor

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

2595651

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

RECEIVED

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TC 1000 MAIL ROOM

Applicant's or agent's file reference PCT79	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP98/04187	International filing date (day/month/year) 17 September 1998 (17.09.98)	Priority date (day/month/year) 17 September 1997 (17.09.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, A61K 38/17, 38/57, C07K 14/525		
Applicant MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.	
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).	
These annexes consist of a total of _____ sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I	<input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II	<input type="checkbox"/> Priority
III	<input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV	<input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V	<input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI	<input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII	<input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII	<input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 06 April 1999 (06.04.99)	Date of completion of this report 09 December 1999 (09.12.1999)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP98/04187

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP98/04187

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 7

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 7 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See supplemental sheet for continuation of Box III. 1.

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 7.

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.  
PCT/JP 98/04187

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III. 1.

Claim 7 is a method for treatment of the human body  
by therapy.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 98/04187

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	2-6	<b>YES</b>
	Claims	1	<b>NO</b>
Inventive step (IS)	Claims	2, 3, 4	<b>YES</b>
	Claims	1, 5, 6	<b>NO</b>
Industrial applicability (IA)	Claims	1-6	<b>YES</b>
	Claims		<b>NO</b>

**2. Citations and explanations**

Document 1 : M. Tanaka, et al., : Fas ligand in human serum", Nature Medicine (1996), Vol. 2, No. 3, pp. 317-322

Document 2 : T. Takahashi, et al., "Human Fas ligand : gene structure, chromosomal location and species specificity", International Immunology (1994), Vol. 6, No. 10, pp. 1567-1574

Claims 1 and 5

Document 1 describes soluble Fas ligand cleaved from membranes by means of a metalloprotease.

Document 2 describes the cDNA sequence and amino acid sequence of human Fas ligand.

The soluble Fas ligand described in Document 1 above can be said to be protease resistant, because it is not cleaved by the metalloprotease.

Therefore, the ligand derivative disclosed in Claim 1 can be considered to be the ligand described in Document 1.

And on the basis of the sequence described in Document 2, a person skilled in the art could easily

determine the DNA sequence coding the ligand derivative above by using commonly known methods.

Therefore, the invention according to Claim 5 could have been easily derived by a person skilled in the art from the disclosures of Documents 1 and 2.

Claim 6

Document 2 indicates that soluble Fas ligand contributes via apoptosis to various human illnesses, and therefore a person skilled in the art could easily deduce the application of said ligand as an apoptosis regulator.